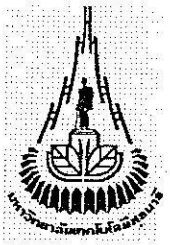
รหัสโครงการ SUT3-305-47-24-12



รายงานการวิจัย

การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักและผลิตภัณฑ์ปลาหมักดอง

Biogenic Formation in Anchovies and Fermented Fish Products

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547 - พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2547 - 2548 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุชาดา อุดมพร คุณนัทธีวรรณ อุดมศิลป์ คุณเสาวนีย์ ปีวิสาร และคุณวรางคณา ไพศาลธรรม ที่ปฏิบัติงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยจัดทำเอกสารการเบิกจ่ายและจัดทำบัญชีด้วยความเรียบร้อย

บทคัดย่อ

ปลากะตัก (*Stolephorus indicus*) ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตน้ำปลามีการสะสมของฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และ ไทรามีน ในปริมาณสูงเมื่อเกิดการเน่าเสียที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แต่เมื่อเก็บปลาในน้ำแข็งเป็นเวลา 13 วันจนเกิดการเน่าเสีย มีเพียงปริมาณฮีสตามีนเท่านั้นที่เพิ่มขึ้น *Morganella morganii* คือแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกในปริมาณสูงที่คัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียที่ 25°ซ ซึ่งไม่เพียงแต่ผลิตฮีสตามีน แต่ยังผลิตพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนได้สูง ในขณะที่ *Pseudomonas fluorescens* คือแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียในน้ำแข็งเป็นเวลา 13 วันซึ่งสามารถสร้างพิวเทรสซีนในปริมาณสูง อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนจากปลากะตัก เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* (Pseudomonad isolation, PI) และอาหาร Thiosulfate Citrate bile agar (TCBS) จากผลการวิจัยพบว่าอาหารไนเวน (Niven medium) ซึ่งใช้คัดกรองแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนเป็นการเบื้องต้นนั้นไม่แสดงผลบวกที่ผิดพลาด (False-positive)

จากการวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านได้แก่ ปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม พบปริมาณไบโอจีนิกเอมีนสูงเกินค่ามาตรฐานสากล (5-10 มก./100 ก.) ในหลายตัวอย่าง ตัวอย่างปลาร้าที่ทดสอบมีค่าคาดาเวอรีนและไทรามีนสูง ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนมีความผันแปรสูงระหว่างตัวอย่างแหนมปลา โดยพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และฮีสตามีน คือไบโอจีนิกเอมีนหลักที่พบในบางตัวอย่าง คาดาเวอรีนคือไบโอจีนิกเอมีนหลักที่พบในปลาส้มโดยมีค่าสูงสุด 22.83±1.13 มก./100 ก. แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ชอบเกลือปานกลางเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบในทุกตัวอย่างปลาร้า ในขณะที่ *Pseudomonas* และ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นร่วมกับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในตัวอย่างแหนมปลาและปลาส้ม แม้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น แต่กลับไม่พบการสร้างไบโอจีนิกในแบคทีเรียกลุ่มนี้ แบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักเหล่านี้คือ *Enterobacter aerogenes, Providencia rettgeri, M. morganii, Klebsiella ornithinolytica,* และ *Staphylococcus xylosus* โดย *E. aerogenes* ที่คัดแยกจากตัวอย่างปลาส้มแสดงความสามารถในการผลิตฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีนสูงในปริมาณ 117.62±2.10, 204.77±1.28 และ 64.49±0.44 มก./100 มล. ตามลำดับ ในอาหารเหลวมูลเลอร์ (Moller broth)

ผลิตภัณฑ์ปลาดองเค็มได้แก่ ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็ม มีปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีนสูงในช่วง 27.77-46.27, 22.13-23.34 , และ 112.97-155.38 มก./100 มล. ตามลำดับ แบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงที่คัดแยกจากตัวอย่างเหล่านี้ สามารถระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Pseudomonas aeruginosa, Photobacterium damsela,* และ *S. xylosus* โดยไบโอจีนิกเอมีนหลักที่

สร้างโดยแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเหลวมูลเลอร์คือ ฮีสตามีน ซึ่งสร้างได้สูงสุด 43.85±4.14 มก./100 ก. โดย *S. xylosus*

จากการศึกษาผลของสารเติมแต่งอาหาร ไกลซีน เอธิลีนไดเอมีนเทตราอะซิติกเอซิด (อีดีทีเอ, EDTA) เกลือโซเดียมคลอไรด์ กรดแล็กติกและซิตริก ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงคือ *M. morganii* และ *E. aerogenes* ซึ่งคัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียและปลาส้ม ตามลำดับ พบว่าไกลซีน (5%) EDTA (0.5%) และเกลือโซเดียมคลอไรด์ (10%) ไม่มีผลทำลายแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด แต่มีผลลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีน ไกลซีนที่ระดับความเข้มข้น 5% ลดการสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของ *E. aerogenes* ลง 85 และ 48% ตามลำดับ ในขณะที่ลดการสร้างฮีสตามีนของ *M. morganii* ลงเพียง 34% สาร EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% มีประสิทธิภาพในการลดฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของ *M. morganii* ได้ดีกว่า *E. aerogenes* ในขณะที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% สามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียทั้งสองได้อย่างมีประสิทธิภาพ กรดแล็กติกและซิตริกที่ความเข้มข้น 1% มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของ *M. morganii* และ *E. aerogenes* สารเติมแต่งอาหารที่ทดสอบแสดงศักยภาพในการลดการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน และ/หรือลดความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียเหล่านั้น

Abstract

Indian anchovy (*Stolephorus indicus*), a major raw material of fish sauce, accumulated high levels of histamine, putrescine, cadaverine, and tyramine as it underwent spoilage at ambient temperature (25°C) for 16 h. But only histamine increased when anchovies were stored in ice for 13 days. *Morganella morganii* was a strong biogenic amine former isolated from anchovy decomposed at 25°C. It produced not only histamine but also putrescine and cadaverine in high amounts. *Pseudomonas fluorescens* was isolated from anchovy stored in ice for 13 days and showed high putrescine-producing ability. Plate count agar (PCA) was shown to be the most effective medium for the initial isolation of biogenic-forming bacteria from decomposed anchovies as compared to selective media, namely Pseudomonad isolation (PI) and Thiosulfate Citrate bile agar (TCBS). Based on this study, Niven medium used for initial screening of histamine formers did not show a false-positive result.

When various traditionally-fermented fish products, namely Pla-ra, Nham-pla, and Pla-som, were tested for biogenic amine content, high biogenic amine contents exceeding the international maximum allowable limit (5-10 mg/100 g) were found in some samples. Most of Pla-ra samples tested contained high amounts of cadaverine and tyramine. The content of biogenic amines greatly varied among Nham-pla samples with putrescine, cadaverine, and histamine being major biogenic amines in some samples. Cadaverine appeared to be a major biogenic amine detected in Pla-som with the highest amount of 22.83 ± 1.13 mg/100g. Moderately halophilic lactic acid bacteria appeared to be prevalent in all Pla-ra samples, while *Pseudomonas* and Enterobacteriaceae were predominantly found along with lactic acid bacteria in Nham-pla and Pla-som samples. Despite of the prevalence of lactic acid bacteria in these fermented fish products, none of them were found to produce biogenic amines. Biogenic amine-forming bacteria isolated from these products were identified as *Enterobacter aerogenes*, *Providencia rettgeri*, *M. morganii*, *Klebsiella ornithinolytica,* and *Staphylococcus xylosus*. In Moller broth, *E. aerogenes* isolated from Pla-som showed ability to produce histamine, putrescine, and cadaverine at the high level of 117.62±2.10, 204.77±1.28, and 64.49±0.44 mg/100 ml, respectively.

Salted fish products, namely salted Spanish mackerel and salted mackerel, contained high amounts of histamine, putrescine, and cadaverine in the range of 27.77-46.27, 22.13-23.34 , and 112.97-155.38 mg/100 g, respectively. Bacteria identified as biogenic amine producers isolated from these products were *Pseudomonas aeruginosa, Photobacterium damsela,* and *S. xylosus.*

The major biogenic amine produced by these bacteria in Moller broth was histamine with the highest amount of 43.85±4.14 mg/100g by *S. xylosus*.

The effect of food additives including glycine, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium chloride, lactic and cirtic acid on inhibition and biogenic amine production of strong biogenic amine-producing bacteria, namely *M. morganii* and *E. aerogenes* isolated from decomposed anchovy and Pla-som, was investigated. Glycine (5%), EDTA (0.5%), and sodium chloride (10%) did not show bactericidal effect on both tested bacteria, but they significantly reduced their biogenic amine-forming ability. Glycine at 5% reduced histamine and putrescine formation of *E. aerogenes* by 85 and 48%, respectively, while lesser effect (34%) was observed in histamine formation of *M. morganii*. EDTA at 0.5% appeared to be more effective in reducing histamine and putrescine formation of *M. morganii* than *E. aerogenes,* while 10% NaCl effectively inhibited formation of major biogenic amines of these bacteria. Lactic and citric acid at 1% completely inhibited growth and biogenic amine formation of *M. morganii* and *E. aerogenes*. All food additives tested showed potential to reduce biogenic amine formers and/or their biogenic amine-forming ability.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ก
บทคัดย่อ ภาษาไทย		ข
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ		ง
สารบัญ		ฉ
สารบัญตาราง		ช
สารบัญรูปภาพ		ฌ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
	การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	2
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	13
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	13
บทที่ 2	วิธีดำเนินการวิจัย	14
	วัสดุและสารเคมี	14
	วิธีการทดลอง	14
บทที่ 3	ผลการวิจัย	24
บทที่ 4	บทสรุป	70
	ข้อเสนอแนะ	71
เอกสารอ้างอิง		72
ภาคผนวก		77

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	ปริมาณเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหาร	7
ตารางที่ 2.1	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักและแหล่งที่ผลิต	17
ตารางที่ 3.1	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างปลากะตักสดและเน่าเสียที่สภาวะต่างๆ	24
ตารางที่ 3.2	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลากะตักเก็บในสภาวะต่างๆ และนำมาคัดเลือกเชื้อบนอาหารไนเวน	27
ตารางที่ 3.3	ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และผลการระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลากะตักจำนวน 17 ไอโซเลท	31
ตารางที่ 3.4	ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่คัดแยกจากปลากะตัก	35
ตารางที่ 3.5	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านแบบเค็ม	36
ตารางที่ 3.6	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์แหนมปลาจากแหล่งผู้ผลิตต่างๆ	37
ตารางที่ 3.7	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาส้ม	40
ตารางที่ 3.8	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม	41
ตารางที่ 3.9	คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้าน	42
ตารางที่ 3.10	จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม ที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	43
ตารางที่ 3.11	จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์แหนมปลาที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	44
ตารางที่ 3.12	จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	45
ตารางที่ 3.13	จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 3.14	จำนวนไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และจากการทดสอบความสามารถในการ สร้างไบโอจีนิกเอมีนในขั้นคัดกรองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไนเวน	49
ตาราง 3.15	ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และผลการระบุชนิด /สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 18 ไอโซเลท จากตัวอย่างปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม	51
ตารางที่ 3.16	จำนวนไอโซเลทที่คัดแยกจากปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	55
ตารางที่ 3.17	ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และผลการระบุชนิด /สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 19ไอโซเลท จากตัวอย่างปลาเค็ม	56
ตารางที่ 3.18	ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดต่างๆ	62
ตารางที่ 3.19	ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทู	64
ตารางที่ 3.20	ผลของสารเติมแต่งอาหารชนิดต่างๆต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย 2 ชนิด	65
ตารางที่ 3.21	ผลของสารเติมแต่งต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีน (มก./100 มล.) ของเชื้อที่คัดแยกจากปลากะตักและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก	69

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1.1	การเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนโดยเอนไซม์ต่างๆในร่างกาย	6
รูปที่ 3.1	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรแบคทีเรียที่ตรวจนับบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆของปลากะตักสดและเน่าเสียที่สภาวะต่างๆ	26

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines) คือสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน โดยเอนไซม์อะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (Amino decarboxylase) ไบโอจีนิกเอมีนที่มักพบในอาหารได้แก่ ฮีสตามีน (Histamine) ไทรามีน (Tyramine) คาดาเวอรีน (Cadaverine) เป็นต้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน (Histidine) ไทโรซีน (Tyrosine) และ ไลซีน (Lysine) ตามลำดับ ไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา (Malle et al., 1996) และอาหารหมักดอง (Maijala et al., 1995) การปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารสามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ อาการเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมงหลังการบริโภค โดยมีอาการแพ้เป็นผื่นที่คอและหน้า เหงื่อออกมาก ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง (Taylor, 1986) ปริมาณฮีสตามีนต่ำ (น้อยกว่า 50 ppm) ถือเป็นสิ่งปกติที่พบได้ในอาหาร ส่วนปริมาณฮีสตามีนที่สูงกว่า 1,000 ppm สามารถทำให้ผู้บริโภคมีอาการอาหารเป็นพิษรุนแรงได้ ฮีสตามีนเป็นสารที่ทนความร้อนสูง ความร้อนที่ใช้ในกระบวนผลิตอาหารไม่สามารถทำลายฮีสตามีนได้ (Gibson, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าไบโอจีนิกเอมีนบางชนิดเช่น พิวเทรสซีน (Putrescine) มีผลเสริมความรุนแรงของฮีสตามีนด้วย (Taylor, 1986)

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสคู่อาหารไทย ด้วยกระแสความนิยมบริโภคอาหารไทยในต่างประเทศ ปริมาณการส่งออกน้ำปลาจึงขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ในปีพ.ศ. 2551 มูลค่าส่งออกน้ำปลาของประเทศไทยคือ 1,019.99 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมาร้อยละ 18.31 ปัจจุบันตลาดน้ำปลาในต่างประเทศของไทยมีการแข่งขันเพิ่มมากขึ้นโดยคู่แข่งสำคัญ คือ เวียดนาม และฟิลิปปินส์ ซึ่งมีข้อได้เปรียบในด้านแรงงานและวัตถุดิบ (http://fic.nfi.or.th) ปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลาเป็นดัชนีคุณภาพของน้ำปลาไทยในต่างประเทศ แม้ว่าปริมาณฮีสตามีนที่สูงในน้ำปลาอาจไม่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษแก่ผู้บริโภค เนื่องจากปริมาณการบริโภคค่อนข้างน้อยคือโดยเฉลี่ย 23.5 กรัมต่อคนต่อวัน (อมรา, 2533) หากแต่ปริมาณสูงเกินค่ามาตรฐานนั้นไม่เป็นที่ยอมรับ และยังสามารถใช้เป็นข้อกล่าวอ้างเพื่อกีดกันทางการค้าได้อีกทางหนึ่ง

จากการศึกษาปัญหาฮีสตามีนในน้ำปลาของคณะวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสาเหตุสำคัญของฮีสตามีนเกิดจากการใช้วัตถุดิบปลากะตักที่มีคุณภาพไม่สดเป็นสำคัญ กระบวนการหมักไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณฮีสตามีน (Yongsawatdigul et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ปลาไม่สดไม่เพียงแต่ทำให้เกิดฮีสตามีนเท่านั้น ยังทำให้เกิดสารไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆในปริมาณสูงด้วยเช่น คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน ถึงแม้ในขณะนี้ประเทศคู่ค้าไม่มีข้อกำหนดสำหรับสารไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ นอกจากฮีสตามีน แต่ก็เป็นที่

ทราบกันดีว่าการมีสารไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้ในปริมาณสูงเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความไม่ถูกสุขลักษณะหรือการใช้ปลาที่มีคุณภาพเน่าเสียมาเป็นวัตถุดิบ ซึ่งย่อมไม่เป็นไปตามหลักการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices) นอกจากนี้สารไบโอจีนิกเหล่านี้เช่น พิวทรีซีน ยังมีผลช่วยเสริมความเป็นพิษของฮีสตามีนด้วย (Taylor, 1986)

Tanasupawat and Komagata (1995) พบ *Tetragenococcus halophilus* ในน้ำปลา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saisithi (1994) ที่พบ *T. halophilus* จำนวนมากในวันที่ 13 ของการหมักจนถึงเดือนที่ 3 Satomi *et al.* (1997) พบ *T. muriaticus* sp. nov. จาก fermented squid liver ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือสูง ต่อมา Kimura *et al.* (2001) ได้รายงานว่า แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 1,153.4 ppm ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด นอกจากนี้ Thongsanit (1999) พบ *T. halophilius* และ *T. muriaticus* ในน้ำปลาไทย ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถสร้างฮีสตามีนในช่วง 0.36-522.9 ppm อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการสร้างไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ ของจุลินทรีย์ดังกล่าว นอกจากมีในผลิตภัณฑ์ปลาหมักเช่น ปลาร้า ปลาส้ม และปลาจ่อมมีเชื้ออยู่หลายชนิดเช่น *T. halophilus, Staphylococcus pisciferm entans, Enterobacter faecalis, S. carnosus, E. hirae, L. fermentum* เป็นต้น (Tanasupawat and Komagata, 1995) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อลักษณะกลิ่น รส ของผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวอาจสามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูง แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้าน ทั้งที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลาย การศึกษาถึงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนและจุลินทรีย์ที่สร้างสารเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านของไทย จะเป็นพื้นฐานการพัฒนาและยกระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านให้ถูกสุขลักษณะตามเกณฑ์มาตรฐานสากลและยังเป็นแนวทางที่จะพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเพื่อการส่งออกอีกด้วย

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ไบโอจีนิกเอมีน คือสารประกอบเอมีนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ของกรดอะมิโนโดยเอนไซม์อะมิโนดีคาร์บอกซิเลส หรือปฏิกิริยาเอมิเนชัน (Amination) และปฏิกิริยาทรานส์เอมิเนชัน (Transamination) ของอัลดีไฮด์หรือคีโตน ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ แต่การสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในอาหารมีสาเหตุจากกิจกรรมของแบคทีเรียเป็นสำคัญ (Maijala et al., 1995) ไบโอจีนิกเอมีนสามารถพบได้ในอาหารหลากหลายชนิด ได้แก่ ปลา (Malle et al., 1996) และผลิตภัณฑ์จากปลา ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Roig-Sague's et al., 1997) และอาหารหมักดอง เช่น เนยแข็ง (Cheese) (Rodriguez-Jerez et al.,1994) ไวน์ (Wine) (Lonvaud-Funel and Joyeux, 1994) เป็นต้น ไบโอจีนิกเอมีนสำคัญที่มักพบในอาหารได้แก่ ฮีสตามีน (Histamine) ไทรามีน (Tyramine) ฟีนิลเอธิลเอมีน (Phenylethylamine) คาดาเวอรีน

(Cadaverine) ทริปทามีน (Tryptamine) สเปอร์มีน (Spermine) และสเปอร์มิดีน (Spermidine) โดยสารตั้งต้นของไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้คือ

กรดอะมิโนฮีสติดีน (Histidine) → ฮีสตามีน (Histamine)
กรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) → ไทรามีน (Tyramine)
กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) → ฟีนิลเอธิลเอมีน (Phenylethylamine)
กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) → คาดาเวอรีน (Cadaverine)
ออร์นิธีน (Ornithine) → พิวเทรสซีน (Putrescine)
กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) → สเปอร์มีน (Spermine)
กรดอะมิโนอาร์จีนีน (Arginine) → สเปอร์มิดีน (Spermidine)
กรดอะมิโนทริปโทแฟน (Tryptophane) → ทริปทามีน (Tryptamine)
กรดอะมิโนไฮดรอกซีทริปทามีน(Hydroxytryptamine) → ซีโรโทนิน (Serotonin)

การปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารสามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในผู้บริโภคได้ โดยอาจเกิดอาการหลังจากบริโภคอาหารเป็นเวลา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง อาการที่พบคือเป็นผื่นที่คอและหน้าเหงื่อออกมาก ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง (Taylor, 1986) ปริมาณฮีสตามีนที่สูงกว่า 100 มก./100 ก. มีผลทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษอย่างรุนแรง ไบโอจีนิกเอมีนบางชนิดเช่น พิวเทรสซีน มีผลเสริมความรุนแรงของฮีสตามีน โดยมีผลยับยั้งเอนไซม์ diamine oxidase และ histamine N-methyltransferase (Stratton et al., 1991) ซึ่งทั้ง 2 เอนไซม์มีบทบาทสำคัญในการลดความเป็นพิษของฮีสตามีน เอนไซม์ทั้งสองนี้อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ช่วยป้องกันการดูดซึมของฮีสตามีนเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ diamine oxidase และ histamine N-methyltransferase ถูกยับยั้งโดยพิวเทรสซีน จึงส่งผลให้เกิดการดูดซึมฮีสตามีนเข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้นและความเป็นพิษเพิ่มขึ้น

<u>บทบาทและความเป็นพิษของไบโอจีนิกเอมีน</u>

สารประกอบไบโอจีนิกเอมีนมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต โดยเป็นสารตั้งต้นและเป็นแหล่งไนโตรเจนของสารสำคัญหลายชนิด คือ ฮอร์โมน อัลคาลอยด์ (Alkaloid) กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) และโปรตีน นอกจากนี้สารเหล่านี้ยังมีผลต่อการควบคุมอุณหภูมิ การรับสารอาหาร และระบบความดันโลหิตของสิ่งมีชีวิต ในเซลล์พืช พิวเทรสซีนซึ่งเป็นสารประกอบไดเอมีน (Diamine) และสเปอร์มีนและสเปอร์มิดีน ซึ่งจัดเป็นสารประกอบพอลีเอมีน (Polyamine) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางสรีระ เช่น การแบ่งเซลล์ การออกดอกและการออกผล รวมถึงความต้านทานต่อสภาวะแวดล้อม สารประกอบพอลีเอมีนยังมีความสำคัญต่อการเจริญและระบบเมตาบอลิซึมของร่างกาย และยังมีผลต่อระบบภูมิต้านทานของระบบทางเดินอาหาร เซลล์ที่มีระบบเมตาบอลิซึมสูงจะมีปริมาณพอลีเอมีน

คือพิวเทรสซีน สเปอร์มีนและสเปอร์มิดีน สูงด้วย ดังนั้นในเซลล์มะเร็งจะมีปริมาณสารเหล่านี้สูงด้วย แนวทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งคือการยับยั้งหรือลดการสร้างพอลีเอมีนในเซลล์

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่ก่อให้เกิดสารประกอบไนโตรซามีน (Nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) โดยเฉพาะสเปอร์มีน และสเปอร์มิดีน เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ จะเกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีน นอกจากนี้พิวเทรสซีนและสเปอร์มิดีนในอาหารที่มีไขมันสูง เช่น เบคอน เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ที่อุณหภูมิสูง เกิดเป็นสารก่อมะเร็ง N-nitrosopyrolidine นอกจากนี้มีรายงานว่าไบโอจีนิกเอมีน เช่น พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน สเปอร์มิดีน มีสมบัติจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ไทรามีนมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) นอกจากนี้สเปอร์มีนยังสามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระของวิตามินอี (Tocopheroxyl radical) ให้กลับมาอยู่ในรูปวิตามินอีได้

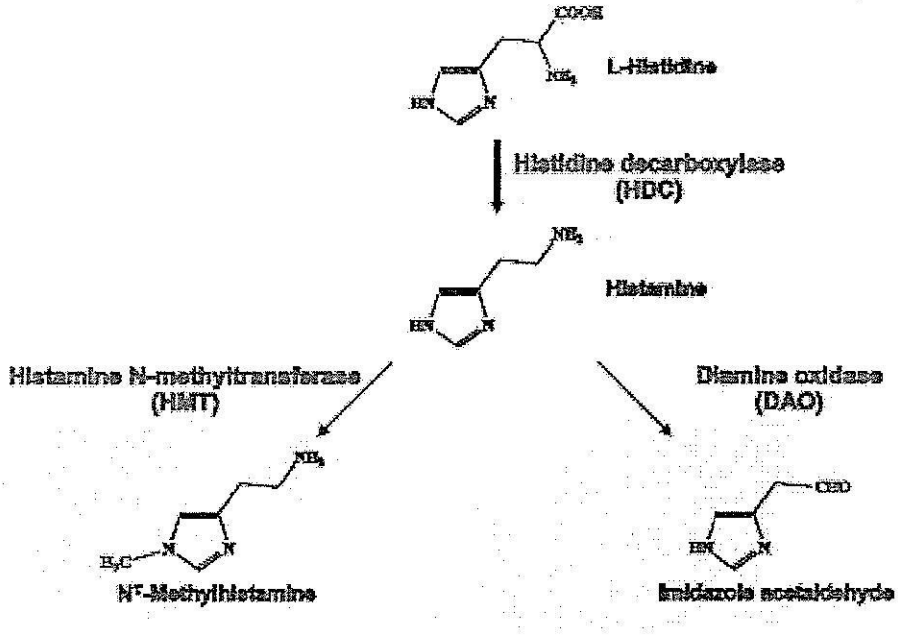
ความเป็นพิษ (Toxicity) ของสารไบโอจีนิกเอมีนมีการศึกษาอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะฮีสตามีน สำหรับผู้ที่อ่อนไหว (Sensitive) ต่อสารฮีสตามีนจะแสดงอาการแพ้เมื่อได้รับฮีสตามีนในระดับ 5-10 มิลลิกรัม ส่วนคนทั่วไปจะแสดงอาการแพ้จากฮีสตามีนเมื่อได้รับในปริมาณ 100 มิลลิกรัม และเป็นพิษอย่างรุนแรงเมื่อได้รับในระดับ 1000 มิลลิกรัม อาการเป็นพิษจากฮีสตามีนในบางครั้งจะเรียกว่า "Scombroid fish poisoning" เนื่องจากฮีสตามีนมักพบในกลุ่มปลา Scombroid เช่น ปลาทูน่า ปลาสันเขียว ปลาทู ปลาอินทรีย์ ปลาซาบะ เป็นต้น ปริมาณฮีสตามีนสูงสุดที่อนุญาตให้มีในอาหารจะแตกต่างตามกฎหมายอาหารของแต่ละประเทศ ในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป กำหนดให้อาหารประเภทปลาดิบ (Raw fish) มีปริมาณฮีสตามีนไม่เกิน 10 มก./100 ก. และต่ำกว่า 20 มก./100 ก. ในปลาวงศ์ Scombridal และ Cenpeidal ดองเค็ม ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้ปริมาณฮีสตามีนในปลาทูน่ากระป๋องและปลาทูน่าสด ไม่เกิน 5 มก./100 ก. ส่วนประเทศสาธารณรัฐสโลวัค กำหนดให้เบียร์มีฮีสตามีนไม่เกิน 20 มก./100 ก. และได้กำหนดให้ปริมาณไทรามีนไม่เกิน 200 มก./100 ก. นอกจากนี้ได้มีข้อเสนอให้เนเธอร์แลนด์และสาธารณรัฐเชค กำหนดมาตรฐานของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์เนื้อในช่วง 10-20 มก./100 ก.

ฮีสตามีนอยู่ใน mast cell และ basophile เมื่อร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ฮีสตามีนจะถูกสร้างออกมามากขึ้น และสามารถเข้าจับกับ receptor ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในระบบหายใจ ระบบหมุนเวียนโลหิต ระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกันและผิวหนัง Receptor ที่สามารถจับฮีสตามีนมี 3 ประเภท ได้แก่ H_1, H_2 และ H_3 ฮีสตามีนมีผลต่อระบบหมุนเวียนโลหิตของร่างกาย โดยทำให้เกิดการขยายตัวของผนังหลอดเลือดฝอยและหลอดเลือดใหญ่ ส่งผลให้ความดันโลหิตลดลง หน้าแดงและปวดศีรษะ การจับตัวของฮีสตามีนและ H_1-receptor ทำให้กล้ามเนื้อเรียบในระบบทางเดินอาหารรัดตัว ส่งผลให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเดินและอาเจียน ฮีสตามีนมีผลให้เกิดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อ H_2-receptor เข้าจับกับฮีสตามีนจะส่งผลให้เกิดผื่นแดงตามร่างกาย ความเป็นพิษจากฮีสตามีนสามารถรักษาได้ด้วยยาต้านฮีสตามีน (Antihistamine) สารที่สามารถจับกับ H_1-receptor สามารถใช้เป็นยารักษาอาการ

ภูมิแพ้ ส่วนสารที่จับกับ H_3-receptor ซึ่งเป็น receptor ที่เพิ่งค้นพบใน ค.ศ. 1983 สามารถใช้เป็นยารักษาความบกพร่องของระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่ง H_3-receptor นี้มีบทบาทต่อการเรียนรู้และความจำ (Karovicova and Kohajdova, 2005)

<u>กระบวนการกำจัดพิษ (Detoxification) ของฮีสตามีน</u>

ในร่างกาย ฮีสติดีนจะถูกเปลี่ยนเป็น urocanic acid โดยเอนไซม์ L-histidine ammonium lyase เกิดกลูตาเมต (Glutamate) และแอลฟา-คีโตกลูทาเรท (α-Ketoglurate) ซึ่งสารทั้งสองนี้จะเข้าสู่ citric acid cycle ต่อไป นอกจากนี้ ฮีสติดีนยังถูกเปลี่ยนเป็นฮีสตามีนโดยเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซีเลส ความเป็นพิษของฮีสตามีนจะลดลงเมื่อเกิดปฏิกิริยา methylation ที่ imidazole ring ของอีสตามีน เกิดเป็น N-methylhistamine โดยเอนไซม์ histamine N-methyltransferase (HMT) จากนั้น N-methylhistamine จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) เกิดผลิตภัณฑ์ N-methylimidazolylacetic acid ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นโดยมี S-adenosylmethionine เป็นสารที่ให้กลุ่มเมธิล (methyl) ในปฏิกิริยา ดังนั้นเอนไซม์ HMT และ MAO มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการลดความเป็นพิษของฮีสตามีน นอกจากนี้ฮีสตามีนยังสามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็น imidazole acetaldehyde โดยเอนไซม์ diamine oxidase (DAO) เอนไซม์ MAO และ DAO นี้อยู่ที่เยื่อบุกระเพาะอาหาร (Gut epithelium) ดังนั้นผลผลิตจากกระบวนการออกซิเดชันของฮีสตามีนโดยเอนไซม์ทั้งสองจึงเข้าสู่กระแสโลหิตได้ง่าย การเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนโดยเอนไซม์ต่างๆแสดงดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 การเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนโดยเอนไซม์ต่างๆในร่างกาย

ที่มา: http://www.ehrs.org.uk/schwelberger.pdf

การเกิด N-methylation เป็นปฏิกิริยาสำคัญที่ทำให้ฮีสตามีนหมดสภาพของการเป็นสาร neurotransmitter ในสมอง และยังเป็นปฏิกิริยาสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของฮีสตามีนใน bronchial epithelium นอกจากนี้ฮีสตามีนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารไม่มีพิษ acetylhistamine ในลำไส้โดยเอนไซม์จากแบคทีเรีย ไตมีความสามารถในการกำจัดฮีสตามีนโดยเปลี่ยนฮีสตามีนให้อยู่ในรูป methylated histamine และขับออกทางปัสสาวะ โดยปกติไบโอจีนิกเอมีนที่ปนเปื้นกับอาหารจะถูกร่างกายกำจัดโดยเอนไซม์เอมีนออกซิเดส ส่วนผู้ที่มีอาการแพ้หรือผู้ที่ได้รับยาที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ MAO จะส่งผลให้เกิดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในร่างกาย เอนไซม์ MAO (EC 1.4.3.4) และ DAO (EC 1.4.3.6) มีบทบาทสำคัญในการลดความเป็นพิษของไบโอจีนิกเอมีนที่มีต่อร่างกาย อย่างไรก็ตาม หากบริโภคอาหารที่มีปริมาณไบโอจีนิกในระดับสูง กระบวนการกำจัดไบโอจีนิกเอมีนโดยเอนไซม์ทั้งสองนี้จะไม่เพียงพอที่จะลดความเป็นพิษของไบโอจีนิกเอมีนได้ (Karovicova and Kohajdova, 2005)

ผู้ที่มีโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร จะเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อสารไบโอจีนิกเอมีนสูงกว่าบุคคลทั่วไป เนื่องจากผู้ป่วยเหล่านี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ MAO ต่ำกว่าบุคคลทั่วไป นอกจากนี้สตรีที่มีประจำเดือนจะมีกิจกรรมของ MAO ลดลง ส่งผลให้มีความเสี่ยงต่ออาหารที่มีไบโอจีนิกเอมีนสูง ผู้ป่วยที่รับประทานยาที่มีฤทธิ์ต้าน MAO, DAO และ HMT เช่นยาในกลุ่ม antihistamine ยาป้องกันมาลาเรียเป็นต้น จะมีความเสี่ยงต่อไบโอจีนิกเอมีนเพิ่มขึ้น ไบโอจีนิกเอมีน เช่น พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีน มีผลยับยั้ง

เอนไซม์ MAO และ DAO ที่ลดความเป็นพิษของฮีสตามีน ดังนั้นไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 2 ชนิดนี้จึงมีผลเพิ่มระดับฮีสตามีนในกระแสเลือด ดังนั้นสารทั้งสองนี้จึงมีผลเพิ่มความเป็นพิษของฮีสตามีน นอกจากนี้ aminoquanidine, anserine, carnosine, agmatine และ tyramine มีผลยับยั้ง DAO ในขณะที่ phenylethylamine, tryptamine, octopamine มีฤทธิ์ยับยั้ง HMT การเกิดแผลในลำไส้เล็กจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดพิษของไบโอจีนิกเอมีนในร่างกายลดลง (Karavicova and Kohajdova, 2005)

การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในอาหาร

ไบโอจีนิกเอมีนสามารถพบได้ในอาหารหลากหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ปริมาณเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหาร

Food	**Biogenic amine**	**Amount (mg/100 g)**
Dry sausage	Histamine	Trace-55.0
	Putrescine	3.1-39.6
	Cadaverine	Trace-5.6
	Tyramine	10.2-150.6
	β-phenylethylamine	ND2-6.1
Vegetables		
Mixed	Histamine	ND-0.1
	Putrescine	0.3-0.7
	Cadaverine	0.6-1.5
	Tyramine	ND-0.7
Sauerkraut	Histamine	0.7-20.0
	Tyramine	2.0-9.5
	Cadaverine	0.3-3.0
	Putrescine	0.1-4.0
Kim chee		
Commercial	Tyramine	0.69
Homemade	Tyramine	2.57
Urame-zuke		
Commercial	Tyramine	0.21
Homemade	Tyramine	0.84

ตารางที่ 1.1 ปริมาณเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก[1] (ต่อ)

Food	Amine	Amount (mg/100 g)
Fish paste	Histamine	7.8-64.0
	Tyramine	ND-37.6
	Cadaverine	ND-3.5
	Tryptamine	ND-16.3
	β-phenylethylamine	ND-60.0
Ziganid fish	Tyramine	0.54
Salted black beans	Tyramine	45.0
Shrimp sauce	Tyramine	24.5
Soy sauce[3]	Histamine	ND-274.0
	Tyramine	ND-466.0
	Tryptamine	ND-93.0
Inyu[3]	Histamine	80.0-462.0
	Tyramine	116.0-3568.0
	Cadaverine	20.0-634.0
	Putrescine	37.0-1234.0
	Tryptamine	51.0-352.0
Toshi	Histamine	0.17-13.8
	Tyramine	22.4-133.7
	Cadaverine	1.3-31.7
	Putrescine	2.2-47.7
	Tryptamine	11.2-57.0
Sufu	Tyramine	49.0
	Putrescine	47.0
Miso	Tyramine	0.02-42.6

[1] Adapted from Stratton et al. (1991)

[2] Not detected

[3] Units for soy sauce and inyu expressed as mg/L

เนื้อปลา

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อปลา เนื้อปลาที่มีคุณภาพความสดต่ำ จะมีปริมาณพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนสูง ปลาในวงศ์ Scombridal และ Carpeidae เช่น ปลาทูน่า ปลาอินทรีย์ ปลาทู เป็นปลาที่มีรายงานถึงการสะสมของฮีสตามีนเมื่อเกิดการเน่าเสีย ปลาเหล่านี้มีปริมาณกรดอะมิโนฮีสติดีนสูง เมื่อเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส กรดอะมิโนฮีสติดีนจะถูกเปลี่ยนเป็นฮีสตามีน สารฮีสตามีนนี้มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูง จึงพบได้ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อ เช่นในผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋อง ดังนั้นหากผลิตภัณฑ์ปลากระป๋องมีปริมาณฮีสตามีนในระดับสูง อาจสันนิษฐานได้ว่าวัตถุดิบปลาที่ใช้ในการผลิตมีคุณภาพความสดต่ำ

Rossi et al. (2002) พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของคาดาเวอรีนในระหว่างการเก็บรักษาปลาทูน่าที่อุณหภูมิห้องมีค่าสูงกว่าการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีน ในขณะที่พิวเทรสซีนมีการเพิ่มในอัตราที่ช้ากว่า ดังนั้นปริมาณคาดาเวอรีนจึงอาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาทูน่าร่วมกับฮีสตามีนได้ สำหรับในปลากะตักพบว่าตัวอย่างที่เน่าเสียหลังจากเก็บที่ 35 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีการสะสมของทั้งฮีสตามีน คาดาเวอรีน พิวเทรสซีนและไทรามีน (Yongsawatdigul et al., 2004) ดังนั้นไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลากะตักได้ นอกจากนี้ Veciana-Nogués et al. (1990) พบว่าฮีสตามีนและไทรามีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บปลา anchovy (*Engraulis encrasicholus*) ทั้งที่สภาวะ 4-6°ซ และ 18-22°ซ ดังนั้นไทรามีนและฮีสตามีนจึงอาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความสดของปลา anchovy ได้

แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งเป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลาทูน่าได้แก่ *Enterobacter aerogenes, Pseudomonas putrefaciens, Aeromonas hydrophila, Proteus vulgaris, Clostridium perfringens, Vibrio alginolyticus* (Middlebrooks et al., 1988) และ *Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Hafnia alvei* (Ward, 1994) Ben-Gogirey et al. (2000) แยกเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* จากปลาทูน่า albacore ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตคาดาเวอรีนได้สูงถึง 1736-4821 ppm ภายใน 48 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปลากะตักสดซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำปลามีปริมาณฮีสตามีน คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน เพิ่มขึ้นจาก 14.0, 15.5, 0, 46.9 ppm เป็น 2006.9, 863.4, 259.9, 273.2 ppm เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเน่าเสียที่ 35°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Yongsawatdigul et al., 2004)

Ababouch et al. (1991) คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจากตัวอย่างปลาซาร์ดีนที่เก็บในน้ำแข็งและที่อุณหภูมิห้องและพบว่าแบคทีเรียกลุ่มหลักคือ Enterobacteriaceae ได้แก่ *M. morganii, P. vulgaris, P. mirabilis, Providencia stuarii* และเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนในหลอดทดลอง

พบว่า *Proteus* สามารถสร้างฮีสตามีนที่ pH 5 ได้สูงกว่าที่ pH 7 และที่อุณหภูมิ 25°ซ ได้สูงกว่าที่ 4 และ 35°ซ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 8% สามารถยับยั้งการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียเหล่านี้ที่ 4°ซ ได้ Kim et al. (2002) พบว่าเกิดการสะสมของฮีสตามีนสูงสุดในปลา mackerel, albacore tuna และ mahi-mahi เมื่อเก็บที่ 25°ซ นอกจากนี้ยังพบว่าแนวทางในการควบคุมปริมาณฮีสตามีนคือการเก็บปลาที่อุณหภูมิ 4°ซ หรือแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเมื่อนำปลาแช่แข็งมาทำละลาย (Thawing) ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างการทำละลาย แบคทีเรียที่พบในปลา albacore tuna ที่สดและไม่สดคือ *H. alvei* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนในระดับ 26.4-497 ppm แต่แบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดคือ *M. morganii* ซึ่งสามารถผลิตฮีสตามีนได้สูงถึง 3582-3672 ppm (Kim et al., 2001) แบคทีเรียที่คัดแยกจากปลา emperor (*Lethrinus miniatus*) และกุ้ง (*Penaues semisulcatus*) ที่สามารถผลิตคาดาเวอรีนและพิวเทรสซีนได้แก่ บางชนิดในสกุล *Flavobacterium, Shewanella, Alcaligenes* และ *Bacillus* และชนิด *Micrococcus luteus* และ *M. varians* ทั้งนี้ไม่พบแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน (Lakshmanan et al., 2002) และเนื่องจาก *Aeromonas* และ *Photobacterium* สามารถดำรงชีวิตอยู่ในปลาและกุ้งแช่น้ำแข็งเป็นเวลานาน จึงสันนิษฐานว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาจมีบทบาทต่อการสะสมไบโอจีนิกเอมีนในปลาและกุ้งแช่น้ำแข็ง ส่วนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนที่คัดแยกได้จากปลากะตักที่เก็บที่ 15 และ 35°ซ คือ *M. morganii, E. aerogenes, P. vulgaris* และ *Staphylococcus xylosus* (Rodtong et al. 2005) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 1,000-2,000 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม mesophiles ที่สามารถผลิตฮีสตามีนที่อุณหภูมิประมาณ 25-35°ซ แล้ว Ryser et al. (1984) ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม psychrotrophs เช่น *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens, P. putida* และ สามารถสร้างฮีสตามีนได้แต่ในระดับที่ต่ำคือประมาณ 32 ppm

<u>ผลิตภัณฑ์ผักดอง</u> (Karovicova and Kohajdova, 2005)

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสะสมปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในกระหล่ำปลีดอง (Sauerkraut) ได้แก่

1. *Leuconostoc mesentreoides* ซึ่งผลิตพิวเทรสซีนในระดับ 25 มก./100 ก.
2. *Lactobacillus* sp. ผลิตพิวเทรสซีนและไทรามีน
3. *Pediococcus cerevisiae* ผลิตฮีสตามีนในระดับ 200 มก./100 ก.

นอกจากนี้ยังพบคาดาเวอรีน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน สเปอร์มิดีน และไทรามีน ในผลิตภัณฑ์ผักดองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก ในผลิตภัณฑ์หมักดองของกลุ่มประเทศเอเชีย เช่น ผักดองญี่ปุ่นและเกาหลี (กิมจิ) มีปริมาณไทรามีนต่ำมาก สำหรับมิโซะ (Meso) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น

ซึ่งมีส่วนผสมของถั่วเหลือง ข้าวสาลี และเกลือ และผ่านกระบวนการหมักโดยรา ยีสต์ และแบคทีเรียพบทั้งไทรามีนและฮีสตามีน

ผลิตภัณฑ์นม

เนยแข็งเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีการสะสมของไบโอจีนิกเอมีน โดยพบได้ในระดับ 100 มก./100 ก. เนื่องจากเนยแข็งประกอบด้วยโปรตีน เอนไซม์โปรติเนส โคแฟกเตอร์ น้ำ และเกลือ ซึ่งเอื้ออำนวยให้แบคทีเรียเจริญและสร้างไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างการบ่ม (Rodriguez-Jerez et al., 1994)

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

ในเนื้อหมูสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมูแปรรูปมีปริมาณอะดรีนาลีน (Adrenaline) สเปอร์มิดีน และสเปอร์มีนในระดับสูง แต่มีปริมาณนอร์อะดรีนาลีน (Noradrenaline) พิวเทรสซีน ฮีสตามีน คาดาเวอรีน และไทรามีน ต่ำ ปริมาณคาดาเวอรีนที่สูงในเนื้อวัว มีความสัมพันธ์กับประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีรายงานการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Fermented meat) โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อ (Haijala and Eerola, 1993) ปริมาณไทรามีนที่สูงในไส้กรอกหมักเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียกรดแล็กติก ฮีสตามีนและไทรามีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนหมักไส้กรอกแบบแห้ง (Dry sausage) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มที่ยาวนาน โดยพบว่าปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 10 เท่าในช่วง 3 วันแรกของการบ่ม ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของประเทศสเปน พบปริมาณไทรามีนในระดับสูง นอกจากนี้ยังพบพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน ฮีสตามีน และฟีนิลเอซีลเอมีน การสะสมของปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในเนื้อหมักเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในวัตถุดิบ และอาจเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการหมัก (Roig-Sagues et al., 1997)

ผลิตภัณฑ์ปลา

ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาแปรรูปเป็นอาหารที่มีการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนที่มีการศึกษามากที่สุด ปลาในกลุ่ม scombroid เป็นปลาที่มีปัญหาของการสะสมฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนมากที่สุด ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษจากฮีสตามีนที่เรียกว่า scombrotoxicosis ปลาเหล่านี้มีปริมาณฮีสติดีนอิสระในกล้ามเนื้อในปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส นอกจากนี้ไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ ที่พบในเนื้อปลาได้แก่ พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน ไทรามีน สเปอร์มีน และสเปอร์มิดีน ซึ่งพบในปลาแมคเคอเรล แฮริ่ง ทูน่า และซาร์ดีน เป็นต้น (Santos, 1996)

ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการสะสมไบโอจีนิกเอมีนอย่างแพร่หลาย คือ ปลาแอนโชวี่ดองเค็ม (Salted anchovy) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลายในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป และเป็นปลาที่มีปริมาณกรดอะมิโนฮีสติดีนในกล้ามเนื้อสูง จึงเกิดการสะสมของฮีสตามีนได้สูง โดยระหว่างการดองเค็มนั้น โปรตีนกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายเกิดอะมิโนอิสระ (ฮีสติดีน) ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนเป็นฮีสตามีนโดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสในระหว่างกระบวนการดองเค็มนี้คือ แบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* โดยเฉพาะ *S. epidermidis* (Hernandez-Herrero et al., 1999)

Saaid et al. (2008) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปลาหมักและกุ้งหมักในประเทศมาเลเซีย และพบว่า บูดูมีปริมาณฮีสตามีนในช่วง 9.9 – 37.3 มก./100 ก. และบางตัวอย่างมีไทรามีนสูงถึง 85.3 มก/100 ก. ส่วนพิวเทรสซีนและสเปอร์มิดีนมีปริมาณต่ำในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์น้ำกุ้งหมักที่เรียกว่า Cinculok มีปริมาณพิวเทรสซีนและไทรามีนค่อนข้างสูง โดยในบางตัวอย่างมีสูงถึง 80.3 และ 68.1 มก./100 ก. ตามลำดับ Yongsawatdigul et al (2004) รายงานปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลาที่ผลิตในประเทศไทย ซึ่งอยู่ในช่วง 14.14 – 78.30 มก./100 ก. นอกจากนี้ พิวเทรสซีนและคาดาเวอรีน ยังเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบในปริมาณสูงคือ 47.2 และ 75.6 มก./100 มล. ตามลำดับ โดยการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์น้ำปลานี้เกิดจากคุณภาพความสดที่ต่ำของปลากะตักที่ใช้เป็นวัตถุดิบ การเพิ่มขึ้นของไบโอจีนิกเอมีนระหว่างกระบวนการหมักไม่มีนัยสำคัญ ปริมาณฮีสตามีนและไทรามีนที่สูงยังพบในตัวอย่างน้ำปลาที่วิเคราะห์โดย Kirschbaum et al. (2000) โดยมีปริมาณสูงถึง 75.7 มก./100 ก. และ 73.9 มก./100 ก. ตามลำดับ ส่วนตัวอย่าง anchovy paste มีปริมาณฮีตามีนเพียง 3.1 มก./100 ก. และมีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆในระดับต่ำด้วย ผลิตภัณฑ์ปลาแอนโชวี่หมักของเกาหลีที่มีชื่อว่า Jeotal มีการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนหลายชนิดในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (Mah et al., 2002) โดยมีปริมาณพิวเทรสซีนในช่วง 9.2 – 24.1 มก./100 ก. คาดาเวอรีน 0 – 66.5 มก./100 ก. ฮีสตามีน 15.5 – 57.9 มก./100 ก. ไทรามีน 6.3 - 24.4 มก./100 ก. และพบสเปอร์มีนและสเปอร์มิดีนในระดับต่ำ ไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์นี้เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเป็นสำคัญ (Mah et al., 2009) Veciana-Nogues et al. (1996) พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาแอนโชวี่ (Semipreserved anchovies) เกิดขึ้นน้อยมากในระหว่างกระบวนการบ่ม (Ripening) ดังนั้นจึงสรุปว่าคุณภาพความสดของวัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่กล่าวมาข้างต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเกิดไบโอจีนิกเอมีนและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านได้แก่ ปลาร้า เหนมปลา (ส้มฟัก) ปลาส้ม ปลาทูเค็มและปลาอินทรีย์เค็ม
3. แยก (Isolate) และระบุ (Identify) ชนิดและ/หรือสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก
4. เพื่อศึกษาผลของสารเติมแต่งอาหาร (Food additive) ที่มีต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic-forming bacteria)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบสาเหตุและชนิดของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน ทราบปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดต่างๆ ซึ่งสำนักคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กรมประมง และ สำนักมาตรฐานอุตสาหกรรม สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในปรับปรุงมาตรฐานของผลิตภัณฑ์เหล่านี้เพื่อการบริโภคและส่งออกยังต่างประเทศ องค์ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลาและผลิตภัณฑ์ปลาหมักดอง จะทำให้เกิดระบบการจัดการที่ดี (GMP) ในกระบวนการผลิต ผู้ประกอบการสามารถพัฒนากระบวนการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ และทราบถึงแนวทางการลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์เหล่านั้นได้อย่างถูกต้อง

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

เก็บตัวอย่างปลากะตัก (*Stolephorus* sp.) จากสะพานปลาช่องแสมสาร จังหวัดชลบุรีโดยเก็บปลาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งหลังจากจับทันที นำเข้าฝั่งภายใน 6 ชั่วโมงหลังการจับ จากนั้นเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ทันที ผลิตภัณฑ์ปลาส้ม แหนมปลา และปลาร้าจากแหล่งผลิตต่างๆ คือ จังหวัดเพชรบูรณ์ ยโสธร สกลนคร ขอนแก่น กาญจนบุรี นครราชสีมา พิจิตร และกรุงเทพมหานคร ผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มจากจังหวัดสมุทรสาครและระยอง

สารมาตรฐานและสารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ได้แก่ histamine dihydrochloride, cadaverine dihydrochloride, tyramine hydrochloride, putrescine dihydrochloride, spermidine trihydrochloride, spermine diphosphate, 1,7-diaminoheptane, histidine monohydrochloride, leucocrystal violet, porcine kidney diamine oxidase, horse radish peroxidase, *o*-phthaldialdehyde สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (Analytical grade)

วิธีการทดลอง

1. การเกิดไบโอจีนิกเอมีนและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก

แบ่งตัวอย่างปลากะตักสดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนที่สองบ่มในน้ำแข็ง (0°ซ) เป็นเวลา 13 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเน่าเสีย จากนั้นบดตัวอย่าง 25 กรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Stomacher (Stomacher 400 Lab Blender, Seward, London, England) แยกเชื้อโดยใช้ Selective media คือ Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (ภาคผนวก ข12) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่ม vibrios, และอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas isolation (PI) agar (ภาคผนวก ข10) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads บ่มให้จุลินทรีย์เจริญที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจน และตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลากะตักสด ปลากะตักที่เน่าเสียที่อุณหภูมิห้อง และปลากะตักแช่เย็น ด้วย Plate count agar (PCA) (ภาคผนวก ข8) โดยแยกบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างปลาสดและตัวอย่างปลาเน่าเสียที่อุณหภูมิห้อง และบ่มที่ 4°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน สำหรับตัวอย่างที่เกิดการเน่าเสียที่ 4°ซ บ่มให้จุลินทรีย์เจริญในสภาพที่มีออกซิเจน เลือกเก็บโคโลนี

ตามความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ใช้แยกเชื้อ แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Cross streak บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) (ภาคผนวก ข13) เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเอียง Tryptic soy agar (TSA-slant) วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างสด และตัวอย่างปลาที่เน่าเสีย ตามรายละเอียดที่ 1.3 ทำการทดลองทั้งหมด 2 ชุดการทดลอง

1.1 <u>การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในขั้นต้นโดยใช้อาหารแข็ง</u>

คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน โดยนำเชื้อจาก TSA-slant มากระตุ้นให้เจริญใน Tryptic soy broth (TSB) (ภาคผนวก ข13) บ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ส่วนไอโซเลทที่คัดแยกได้จากปลากะตักที่เน่าเสียในน้ำแข็ง (แบคทีเรียกลุ่ม psychrophiles) กระตุ้นการเจริญโดยบ่มที่ 4°ซ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้อาหาร TSA agar บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือ 4°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน ขึ้นอยู่กับสภาวะที่คัดแยกเชื้อ นำเชื้อบริสุทธิ์ point inoculation ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven agar (ภาคผนวก ข5) ที่เติมฮีสติดีน 2.7% และบ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ 4°ซ เป็นเวลา 7-10 วันสำหรับแบคทีเรียกลุ่ม psychrophiles คัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงแหวนสีม่วงล้อมรอบโคโลนีเพื่อนำไปทดสอบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนอื่นได้หรือไม่

1.2 <u>การทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของไอโซเลทที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว</u>

ทดสอบผลการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่ให้ผลบวกบนอาหารแข็ง Niven โดยนำแบคทีเรียมากระตุ้นให้เจริญใน TSB บ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง หรือ 4°ซ เป็นเวลา 7 วัน ขึ้นอยู่กับสภาวะที่คัดแยกเชื้อ จากนั้น Cross streak บนอาหาร TSA ย้ายเชื้อ 1 Loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Moller broth (ภาคผนวก ข4) ซึ่งประกอบด้วย L-Lysine, L-Histidine, L-Ornithine, L-Tyrosine อย่างละ 0.4%, Peptone 0.5%, Beef extract 0.5%, Glucose 0.05% และ NaCl 0.5% และบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือ 4°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendoft, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ -20°ซ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC, HP 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, Calif, USA)

1.3 การวิเคราะห์ไบโอจีนิกเอมีน

วิเคราะห์ปริมาณ ฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน พิวเทรสซีน สเปอร์มิดีน และ สเปอร์มีน ในตัวอย่างปลากะตักสด ปลากะตักบ่มที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง และปลากะตักบ่มในน้ำแข็ง (0°ซ) เป็นเวลา 13 วัน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Eerola et al. (1993) สกัดสารไบโอจีนิกเอมีนจากตัวอย่างปลากะตักโดยบดผสมปลากะตัก 5 กรัมในสารละลายกรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid) เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 15 มล. นำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm ที่ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) จากนั้นนำไปสกัด ปั่นเหวี่ยง และกรองอีกครั้ง เติมสารละลาย 1,7-diaminoheptane เข้มข้น 1000 มก./ล. ซึ่งเป็น internal standard ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มล. ส่วนตัวอย่างน้ำปลานั้นเจือจางด้วยสารละลายเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 โมลาร์ 2 หรือ 200 เท่า ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไบโอจีนิกเอมีน จากนั้นเติมสารละลาย internal standard เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มก./ล.

นำสารที่สกัดได้ 1 มล. ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายอิ่มตัวโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายแดนซิลคลอไรด์ (Dansyl chloride) เข้มข้น 10 มก./มล. ในอะซีโตน (Acetone) ปริมาตร 2 มล. นำไปบ่มที่ 45°ซ นาน 45 นาที กำจัดแดนซิลอิสระโดยเติมแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 5 มล. ด้วย acetonitrile โดยใช้ขวดวัดปริมาตร กรองสารละลายผ่านแผ่นเยื่อกรอง 0.45 ไมครอน (Agilent Technologies, Inc., Germany) ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งใช้ diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยตั้งค่าความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ไบโอจีนิกเอมีนโดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 guard column (100×4 mm I.D., 3µm, 100 Å) และ Hypersil BDS C18 (4×4 mm I.D., 5µm, 100 Å) โดย mobile phase ที่ใช้คือสารละลาย ammonium acetate (solvent A) เข้มข้น 0.1 โมลลาร์ และ acetonitrile (solvent B) ที่อัตราการไหล 0.2 มล. /นาที เริ่มต้นใช้ isocratic elution ด้วย solvent B 50% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็น gradient elution โดยเพิ่มสัดส่วนของ solvent B เป็น 90% ภายใน 25 นาที จากนั้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยตัวทำละลาย A และ B อย่างละ 50% เป็นเวลา 23 นาที ก่อนการฉีดตัวอย่างครั้งต่อไป ตั้งค่าอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40°ซ ปริมาตรของการฉีดตัวอย่างคือ 10 ไมโครลิตร

2. ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

เก็บรวบรวมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดต่างๆ จากร้านจำหน่ายสินค้าพื้นเมือง ห้างสรรพสินค้า หรือตลาดสด ในเขตจังหวัดต่างๆ ตามรายละเอียดในตารางที่ 2.1 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและจุลชีววิทยาทันทีเมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักและแหล่งที่ผลิต

Sample	Number of samples	City of origin
Pla-ra (ปลาร้า)	8	Nan (น่าน), Pichit (พิจิตร), Nakhon Ratchasima (นครราชสีมา)
Pla-som (ปลาส้ม)	13	Lopburi (ลพบุรี), Nakhon Ratchasima (นครราชสีมา),Yasothon (ยโสธร), Khon Kean (ขอนแก่น), Petchaboon (เพชรบูรณ์), Kanchanaburi (กาญจนบุรี), Nakhonpatom (นครปฐม)
Nham-pla (แหนมปลา, ส้มฟัก)	13	Bangkok (กรุงเทพมหานคร), Lopburi (ลพบุรี), Nakhon Ratchasima (นครราชสีมา), Nakhon Nayok (นครนายก), Khon Kean ขอนแก่น, Petchaboon (เพชรบูรณ์), Kanchanaburi (กาญจนบุรี), Nakhonpatom (นครปฐม)
Salted Spanish mackerel (ปลาอินทรีย์เค็ม)	3	Rayong (ระยอง)
Salted mackerel (ปลาทูเค็ม)	2	Samutsakorn (สมุทรสาคร)

2.1 <u>คุณภาพทางเคมี</u>

2.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

วิเคราะห์ปริมาณเกลือตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1995) ชั่วตัวอย่าง 1-1.5 ก. ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.7 มล. เติมซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 10 มล. และเติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 65% ปริมาตร 20 มล. ให้ความร้อนด้วยเตาให้ความร้อน

(Hot plate) จนตัวอย่างใสและมีสีเหลืองอ่อนๆ (ประมาณ 45 นาที) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Ferric alum indicator ปริมาตร 5 มล. ไทเทรตกับแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (NH_4SCN) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล บันทึกปริมาตร NH_4SCN ที่ใช้ และคำนวณปริมาณเกลือ

2.1.2 ปริมาณกรด

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากัน หยด Phenolphthalein จำนวน 5 หยดลงในตัวอย่าง แล้วไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล บันทึกปริมาตร และคำนวณปริมาณกรดในรูปของกรดแล็กติก

2.1.3 ปริมาณน้ำอิสระ (Aw)

นำตัวอย่างบดละเอียดใส่ลงในถ้วยใส่ตัวอย่าง (Sample cup) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว และวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระ (AQUA LAB, Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, U.S.A.)

2.1.4 ค่าพี-เอช (pH)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 10 มล. ปั่นให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (Homogenizer) (Nihonseiki Kaisha Ltd., Tokyo, Japan) วัดพี-เอชโดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland)

2.1.5 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน

วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในทุกผลิตภัณฑ์ โดยบดผสมตัวอย่าง 5 กรัมในสารละลายกรดเปอคลอริก เข้มข้น 0.4 โมลลาร์ปริมาตร 15 มล. นำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) จากนั้นนำไปสกัด ปั่นเหวี่ยง และกรองอีกครั้ง จากนั้นเติม internal standard และเตรียมตัวอย่าง ตามรายละเอียดในข้อ 1.3

2.2 คุณภาพทางจุลชีววิทยา

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลา 25 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 225 มล. ผสมตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher (Stomacher 400 Lab Blender, Seward, London, England) แยกและตรวจนับจุลินทรีย์ในทุกผลิตภัณฑ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ คือ Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (ภาคผนวก ข12) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่ม vibrios, อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas isolation (PI) agar (ภาคผนวก ข10) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads, อาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile agar with glucose (VRBG) (ภาคผนวก ข15) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae บ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% (TSA+10%NaCl) บ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจน และใช้อาหาร

MRS (DE MAN, ROGOSA and SHARPE) agar (ภาคผนวก ข3) สำหรับคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยบ่มในสภาพไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 3 วัน และ MRS เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 % (MRS+10%NaCl) บ่มในสภาพไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-5 วัน พร้อมทั้งตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้อาหาร Plate count agar (PCA) บ่มในสภาพที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด ตามความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้อาหารและสภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับขั้นตอนการแยกเพื่อตรวจนับจุลินทรีย์ เก็บเชื้อในกลุ่ม vibrios, pseudomonads และ Enterobacteriaceae ที่แยกได้บนอาหารผิวเอียง TSA (TSA-slant) สำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติก เก็บเชื้อที่แยกได้ในสารละลาย Skim milk เข้มข้น 5% ที่ -20°ซ

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนโดยใช้อาหารแข็ง

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน โดยเตรียมเชื้อในกลุ่ม vibrios, pseudomonads และ Enterobacteriaceae อายุ 18-24 ชั่วโมง บน TSA และแบคทีเรียกรดแล็กติกอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร MRS agar (ที่เติมและไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ตามที่ใช้คัดแยก) บ่มให้แบคทีเรียเจริญตามสภาวะที่คัดแยกเชื้อ Point inoculation เชื้อบริสุทธิ์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven agar ที่เติมฮีสติดีน 2.7% สำหรับ vibrios, pseudomonads และ Enterobacteriaceae แต่สำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Niven agar ที่มีการดัดแปลงสูตรให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย (ภาคผนวก ข6) และบ่มให้แบคทีเรียเจริญตามอุณหภูมิและสภาวะที่ใช้คัดแยก (ข้อ 2.2) คัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงแหวนสีม่วงล้อมรอบโคโลนีเพื่อนำไปทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น

2.4 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของไอโซเลทที่คัดแยกได้

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 โดยทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 2.3 ย้ายเชื้อ 1 Loop ลงในอาหาร Moller broth ซึ่งประกอบด้วย L-Lysine, L-Histidine, L-Ornithine, L-Tyrosine อย่างละ 0.4%, Peptone 0.5%, Beef extract 0.5%, Glucose 0.05% และ NaCl 0.5% (เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ เป็น 10% สำหรับเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10%) และบ่มที่สภาวะต่างๆ ที่ระบุไว้ใน 2.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ 10,000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendoft, Hamburg,

Germany) เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่ -20°ซ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดใน 1.3

3. การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน

ระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สมบัติทางชีวเคมี ตาม Holt et al. (1994) ดังนี้

3.1 <u>การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเซลล์</u>

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียมรอย Smear ของแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบน TSA บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก2) ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเบาๆ หยด Gram's iodine (ภาคผนวก ก4) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95%) หรือ Acetone alcohol (ภาคผนวก ก1) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมา แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก5) เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจดูรูปร่าง โครงสร้าง การเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, Olympus, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

3.2. <u>การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่</u>

เตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 20-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร TSA และแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 3 วัน ที่เจริญบนอาหาร TSA เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% มาทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้ Motility test medium (ภาคผนวก ก1) โดยใช้ Needle เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์แล้วแทงลงใน Motility test medium ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้เชื้อเจริญตามอุณหภูมิและสภาวะที่ใช้คัดแยกเชื้อ (ข้อ 2.2) ตรวจสอบการกระจายของเชื้อจากรอยที่ใส่เชื้อลงไปในอาหาร

3.3. <u>การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี</u>

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบน TSA และทดสอบดังนี้

3.3.1 การสร้างเอนไซม์ Oxidase

วางแผ่นกระดาษกรอง Whatman No. 4 ลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ก6) ลงบนกระดาษกรอง ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ ตรวจดู

การเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ oxidase เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

3.3.2 การสร้างเอนไซม์ Catalase

ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ก3) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้บนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Catalase

3.3.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Proteinase, Amylase และ Lipase

ทดสอบการสร้างเอนไซม์ Proteinase, Amylase และ Lipase โดยใช้อาหาร PCA ที่เติม skim milk (ภาคผนวก ข9), soluble starch และในระดับ Tween 80 1% ตามลำดับ โดย Point inoculation เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจผลการสร้าง Proteinase โดยตรวจดูบริเวณใสรอบโคโลนี (Clear zone) ตรวจผลการสร้าง Amylase โดยหยดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข4) บนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ตรวจดูบริเวณใสรอบโคโลนี (ควรอ่านผลภายใน 2 นาที) และตรวจผลการสร้าง Lipase จากการเกิดตะกอนขุ่นขาวของเกลือแคลเซียมของกรดไขมันรอบโคโลนี

3.3.4 ทดสอบการย่อยเจลาติน

ใส่เชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรงลงในอาหาร Nutrient gelatin (ภาคผนวก ข7) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีรียเจริญที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจน ตรวจผลโดยนำหลอดอาหารที่ใส่เชื้อและหลอดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ) ไว้ที่ 4°ซ นาน 15 นาที ถ้าเชื้อมีเอนไซม์ที่ย่อยเจลาตินได้ Nutrient gelatin จะไม่แข็งตัว

3.3.5 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี API 20E, API 20NE และ API staph (BIO-Merieux, Marcy-l'Etoile, France) ตามกลุ่มของแบคทีเรียโดยเตรียม Suspension ของเซลล์ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ให้มีความขุ่นตาม Turbidity standard ที่สอดคล้องกับข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

4. ผลของสารเติมแต่งอาหารต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีน

เชื้อที่ใช้ทดสอบคือ *E. aerogenes* คัดแยกได้จากปลาส้ม *M. morganii* คัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยสารเติมแต่งที่ศึกษาคือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10%,

สารอีดีทีเอ (EDTA) ในระดับ 0.5%, ไกลซีน ในระดับ 5% และกรดแล็กติกและซิตริก ที่ระดับความเข้มข้น 1% กระตุ้นการเจริญของเชื้อในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) ถ่ายเชื้อ (2% inoculum size) ลงในอาหาร Moller ที่เติมสารต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ปรับ pH ของอาหารเหลว Moller ที่เติมสารเติมแต่งอื่นๆ ยกเว้นกรด มีค่า 7.0 ส่วนตัวอย่างที่เติมกรดแล็กติกและกรดซิตริกมีค่าเท่ากับ 3.3 บ่มเชื้อที่ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเชื้อโดยเทคนิค spread plate บนอาหาร PCA ปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหาร Moller ดังรายละเอียดในข้อ 2.4 และนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนดังรายละเอียดต่อไปนี้

การวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว Moller

เพื่อลดการรบกวน (Interfere) จากสารเติมแต่งที่เติมลงใน Moller การวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในชุดการทดลองนี้จึงใช้วิธีการสกัดตัวอย่างหลังจากกระบวนการ derivatization ด้วย Heptane โดยดัดแปลงจากวิธีของ Dadákoá et al. (2009) โดยนำตัวอย่าง 1 มล. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 11 (เตรียมจากสารละลาย $NaHCO_3$ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 12 มล. ปรับ pH ให้ได้ 9.2 จากนั้นละลาย K_2CO_3 16.65 ก. ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล.) ปริมาตร 1.5 มล. และแดนซิลคลอไรด์ (Dansyl chloride) เข้มข้น 10 มก./มล. ปริมาตร 1.5 มล. บ่มสารผสมที่ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Dansylation อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดแดนซิลคลอไรด์ (Dansyl chloride) ที่คงเหลือจากปฏิกิริยา ปรับปริมาตรสารละลายผสมให้ครบ 5 มล. ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ถ่ายตัวอย่างที่ได้ 5 มล. ลงหลอดฝาเกลียว เติม Heptane ปริมาตร 3 มล. เขย่าแรงๆเพื่อทำการสกัดสารไบโอจีนิกเอมีน ปิเปตของเหลวส่วนบนที่เป็นส่วนของ Heptane ปริมาตร 3 มล. สกัดด้วย Heptane ต่ออีก 2 ครั้ง จนได้ Heptane ปริมาตรรวม 9 มล. จากนั้นนำไประเหย Heptane ด้วยก๊าซไนโตรเจนด้วยเครื่องระเหย (Turbo Vap® LV, Caliper LifeSciences, USA) ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เติม Acetonitrile ปริมาตร 1.5 มล. กรองสารละลายด้วยแผ่นเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนด้วยเครื่อง HPLC (Hewlett-Packard HP 1100, Agilent Technologies, USA) โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB C18 (5µm,150×4.6 mm, Agilent Technologies, USA) ตรวจวัดอนุพันธ์โดย Diode array detector ที่ค่าดูดกลืนแสง 254 นาโนเมตร โดยใช้ช่วงความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นอ้างอิง สารชะประกอบด้วยส่วนผสมของ Mobile phase A และ B โดย Mobile phase A ประกอบด้วย Acetonitrile 100% และ Mobile phase B

ประกอบด้วย Acetonitrile 50% ใช้การชะแบบ Gradient ด้วยอัตราส่วนของ Mobile phase A และ B แสดงดังรายละเอียดข้างล่างนี้ ด้วยอัตราการไหลที่ 0.8 มล./นาที ตั้งค่าอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 28°ซ

เวลา	Mobile phase A	:	Mobile phase B
0 นาที	30%	:	70%
5 นาที	40%	:	60%
10นาที	80%	:	20%
15นาที	95%	:	5%
20นาที	30%	:	70%

บทที่ 3
ผลการวิจัย

การเกิดไบโอจีนิกเอมีนและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก

ปลากะตักสด (F, Fresh) มีไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีนและไทรามีนในระดับต่ำ (ตารางที่ 3.1) เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเน่าเสียที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทุกชนิดเพิ่มสูงขึ้น โดยฮีสตามีนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 320.2 มก./ 100 ก. ซึ่งเป็นค่าที่เกินมาตรฐานความปลอดภัยทางอาหารที่กำหนดให้ปลาสดที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภคจะต้องมีฮีสตามีนไม่เกิน 5 มก./ 100 ก. (สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกา) และ 10 มก./ 100 ก. (สำหรับกลุ่มสหภาพยุโรปและประเทศในเครือจักรภพ) นอกจากนี้คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และ ไทรามีน เป็นไบโอจีนิกเอมีนสำคัญที่เกิดขึ้นในระหว่างการเน่าเสียของปลากะตัก ส่วนสเปอร์มิดีน สเปอร์มีน และ ทริปทามีนไม่ใช่ไบโอจีนิกมีนสำคัญในปลากะตักที่เน่าเสีย ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าไม่เพียงแต่ฮีสตามีนเท่านั้นที่เกิดขึ้นในระหว่างการเน่าเสียของปลากะตักที่อุณหภูมิ 25°ซ แต่ไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นโดยเฉพาะในกลุ่มที่สามารถเพิ่มความเป็นพิษของฮีสตามีน เช่น พิวเทรสซีน ไทรามีน และคาดาเวอรีน ก็เกิดขึ้นในปริมาณสูงด้วย ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าปลากะตักเป็นปลาที่สุ่มเสี่ยงต่อการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนเมื่อเกิดการเน่าเสียที่ 25°ซ ดังนั้นกระบวนการเก็บรักษาปลาหลังการจับ จึงเป็นมาตรการสำคัญที่จะป้องกันการสะสมของปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก การเน่าเสียของปลาซาร์ดีนที่ 25 °ซ ก่อให้เกิดการสะสมของฮีสตามีน คาดาเวอรีน และพิวเทรสซีน โดยฮีสตามีนและคาดาเวอรีนเพิ่มสูงถึง 235 และ 105 มก./100 ก. (Ababouch et al., 1991)ในลักษณะเดียวกับที่พบในปลากะตัก

ตารางที่ 3.1 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างปลากะตักสดและเน่าเสียที่สภาวะต่างๆ

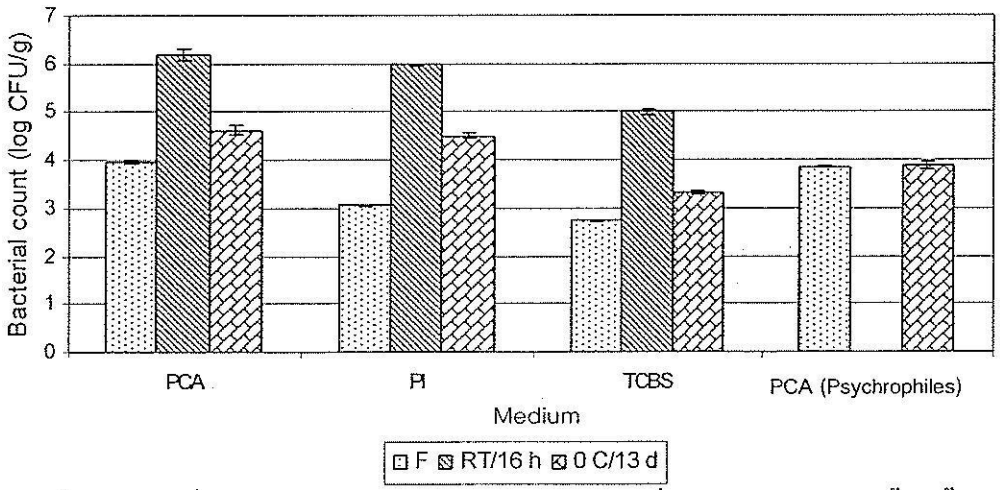
Samples	Biogenic amine content (mg/100g)						
	Tryptamine	Putrescine	Cadavarine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
F	ND	ND	0.80 ± 0.02	2.14 ± 0.08	4.77 ± 0.13	0.64 ± 0.05	1.30 ± 0.04
RT/16h	ND	55.84 ± 10.65	226.17 ± 42.46	320.24 ± 55.41	86.69 ± 18.08	ND	ND
0°C/13d	ND	1.66 ± 0.24	3.30 ± 0.26	124.05 ± 2.27	5.77 ± 1.45	ND	0.86 ± 0.09

ND = Not detected.

การเน่าเสียของปลากะตักในน้ำแข็งมีผลเพิ่มปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีน โดยฮีสตามีนเพิ่มเป็น 124.05 มก./ 100 ก. เมื่อเก็บปลาในน้ำแข็งเป็นเวลา 13 วัน (ตาราง 3.1) เป็นที่น่าสังเกตว่าไบโอจีนิกเอมีนอื่นมีการเพิ่มขึ้นน้อยมากเมื่อเทียบกับฮีสตามีน ดังนั้นการเน่าเสียของปลาในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำเช่นการเก็บในน้ำแข็ง ทำให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนเท่านั้น โดยไม่มีการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น Ababouch et al. (1991) รายงานว่าทั้งฮีสตามีนและคาดาเวอรีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 1 เป็น 100 มก./ 100 ก. ในระหว่างการเก็บปลาชาร์ดีนในน้ำแข็งเป็นเวลา 180 ชั่วโมง ส่วนพิวเทรสซีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเก็บปลา Pacific whiting ในน้ำแข็งเป็นเวลา 25 วัน โดยคาดาเวอรีนมีการเพิ่มขึ้นในลักษณะเดียวกับไตรเมธิลเอมีน (Trimethylamine) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การเน่าเสียของปลา ในขณะที่ไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ (Ruiz-Capillas and Moral, 2001) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปลา Pacific whiting มีปริมาณกรดอะมิโนฮีสติดีนและกรดอะมิโนอื่นๆ ที่เป็นสารตั้งต้นของไบโอจีนิกที่น้อย การสะสมของไบโอจีนิกเอมีนจึงไม่เพิ่มขึ้นสูงในระหว่างการเน่าเสีย ในปลาทูน่า skipjack และ ปลาทูน่า bigeye ที่เน่าเสียในน้ำแข็งจะมีปริมาณคาดาเวอรีนเพิ่มขึ้นในอัตราที่ใกล้เคียงกับฮีสตามีน และมีการเพิ่มขึ้นของพิวเทรสซีนในอัตราที่ช้ากว่าฮีสตามีนและคาดาเวอรีน (Ross et al., 2002) ดังนั้นจึงได้มีการเสนอให้ใช้คาดาเวอรีนเป็นดัชนีบ่งชี้การเน่าเสียของปลาทูน่านอกเหนือจากค่าฮีสตามีน ในขณะที่ปลาดุกยุโรปมีการสะสมของฮีสตามีนน้อยมากโดยมีค่าเพียง 1 มก./100 ก. เมื่อเก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 4-7 วัน (Özogul et al., 2009) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของไบโอจีนิกเอมีนในปลานิลระหว่างการเก็บในน้ำแข็งและอุณหภูมิห้อง ที่ 28 °ซ มีน้อยมากเช่นกัน จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างการเก็บรักษาจะแตกต่างตามชนิดของปลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา จากผลการศึกษานี้พบว่าฮีสตามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนหลักที่พบในปลากะตักที่เน่าเสียที่อุณหภูมิ 25°ซ และในน้ำแข็ง

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ พบว่าปลากะตักสด (F) มีจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม mesophiles และ psychrophiles ประมาณ 4 LogCFU/g และจุลินทรีย์ในกลุ่ม pseudomonads และ vibrios ในระดับ 3 และ 2.8 LogCFU/g ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตัวอย่างเกิดการเน่าเสีย ดังจะเห็นได้จากจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม mesophile เพิ่มขึ้นมากกว่า 6 LogCFU/g (รูปที่ 3.1) เป็นที่น่าสังเกตว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PI เพิ่มขึ้นเป็น 6 LogCFU/g ในขณะที่กลุ่ม vibrios เพิ่มขึ้นเป็น 5 LogCFU/g (รูปที่ 3.1) เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาขึ้นเพื่อคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads ผลการทดลองนี้จึงบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์หลักที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลากะตักเก็บที่อุณหภูมิห้องคือ แบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads เมื่อเหนี่ยวนำให้ตัวอย่างปลากะตักเกิดการเน่าเสียในน้ำแข็งเป็นเวลา 13 วัน (0°C/13 d) พบว่าจุลินทรีย์ mesophiles ทั้งหมด เพิ่มขึ้นเป็น 4.8 LogCFU/g (รูปที่ 3.1) และแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads เพิ่ม

เป็น 4.5 LogCFU/g ใกล้เคียงกับจำนวน mesophiles ทั้งหมด ซึ่งบ่งชี้ว่าแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเน่าเสียของปลากะตักเก็บที่อุณหภูมิต่ำ จำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม vibrios ซึ่งเจริญในอาหาร TCBS เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (3.2 LogCFU/g) เมื่อเทียบกับปลาสด ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่ม vibrios จึงอาจไม่ใช่แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการเน่าเสียของปลากะตักที่เก็บในน้ำแข็ง นอกจากนี้ประชากรของแบคทีเรียในกลุ่ม psychrophiles ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บปลาในน้ำแข็งเป็นเวลา 13 วัน



รูปที่ 3.1 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรแบคทีเรียที่ตรวจนับบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆของปลากะตักสดและเน่าเสียที่สภาวะต่างๆ

จากการสุ่มเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกันจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในแต่ละตัวอย่าง ได้จำนวนทั้งสิ้น 154 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.2) เมื่อนำไปทดสอบบนอาหารวุ้น Niven ปรากฏว่าให้ผลบวกทั้งสิ้น 33 ไอโซเลท คิดเป็น 21.4% ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด โดยไอโซเลททั้งหมดสามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว Moller ซึ่งคิดเป็น 100% ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกบน Niven ตัวอย่างปลาที่เน่าเสียที่ 25°ซ เป็นตัวอย่างที่มีเชื้อที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven สูงสุด สอดคล้องกับตัวอย่างที่พบการสะสมของฮีสตามีนมากที่สุด นอกจากนี้ไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหาร PCA ให้ผลบวกบนอาหาร Niven สูงสุด เป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ว่าอาหาร PI ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการสร้างฮีสตามีนในปลา แต่กลับไม่สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven ได้ และเมื่อทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของไอโซเลทที่ให้ผลบวกจากอาหาร Niven พบว่าทุกไอโซเลทสามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ในอาหาร Moller โดยไม่ให้ผลบวกที่ผิดพลาด (False positive)

ตารางที่ 3.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลากะตักเก็บในสภาวะต่างๆ และนำมาคัดเลือกเชื้อบนอาหาร Niven

Fish sample	Medium used for bacterial isolation											
	PCA			PI			TCBS			PCA (Psychrophiles)		
	Number of collected isolates	Positive isolate on Niven	True biogenic amine producer	Number of collected isolates	Positive isolate on Niven	True biogenic amine producer	Number of collected isolates	Positive isolate on Niven	True biogenic amine producer	Number of collected isolates	Positive isolate on Niven	True biogenic amine producer
Fresh anchovy (F)	16	0	0	16	4	4	16	0	0	20	5	5
Anchovy left at 25°C for 16 h (RT/16 h)	16	11	11	12	0	0	16	6	6	ND	ND	ND
Anchovy left at 0°C for 13 days (0°C/13 d)	12	3	3	16	2	2	9	0	0	5	2	2
Total	44	14	14	44	6	6	41	6	6	25	7	7

Not detected.

โดยปกติแล้วการคัดเลือกแบคทีเรียด้วยอาหาร Niven มักจะให้ผลบวกที่ผิดพลาด Rodtong et al. (2005) พบว่ามีเพียง 27% ของไอโซเลทที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven สามารถสร้างฮีสตามีนได้จริง นอกจากนี้ Kim et al. (2001a) รายงานว่าการใช้อาหาร Niven ในการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนตั้งแต่ขั้นแรก สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้ต่ำ (<30 มก./100 มล.) คือได้เพียง *H. alvei* เท่านั้น Kim et al. (2001b) รายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงจากปลาทูน่า albacore สามารถคัดแยกได้เป็นส่วนใหญ่โดยใช้อาหาร VRBG และบางไอโซเลทคัดแยกจากอาหาร TCBS ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มีประสิทธิภาพสูงในการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจากปลากะตักที่เน่าเสียที่อุณหภูมิห้องและที่เก็บในน้ำแข็ง จาก 33 ไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนที่คัดแยกได้มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 21 ไอโซเลท อาหาร PI 6 ไอโซเลท และอาหาร TCBS 6 ไอโซเลท หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งอาหาร PCA สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนอื่นได้ 64% ส่วนอาหาร PI และ TCBS สามารถคัดแยกได้อย่างละ 18%

การระบุชนิดแบททีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน

แบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนจากปลากะตักสดสามารถคัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI ทั้งหมด 4 ไอโซเลท และกลุ่ม psychrophiles 5 ไอโซเลท จากทั้งหมด 68 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.2) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกจากอาหาร PI ทุกไอโซเลทมีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ (ตารางที่ 3.3) และเมื่อระบุชนิด/สายพันธุ์ของไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI พบว่ามีความเหมือน 99.9% กับแบคทีเรีย *M. morganii* ส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม psychrophiles มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสี แกรมบวก และไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยชุดทดสอบ API *M. morganii* เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการสร้างฮีสตามีนในปลาหลากหลายชนิด รวมถึงปลาทูน่า Albacore (Kim et al., 2001) ปลาอินทรีย์ (Spanish mackerel) (Middlebrooks et al., 1988) และปลาซาร์ดีน (Ababouch et al., 1991) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า แบคทีเรีย *M. morganii* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการสะสมไม่เพียงแต่ฮีสตามีนแต่ไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆในปลากะตัก และแบคทีเรียนี้มีการปนเปื้อนแม้ในปลาสด ดังนั้นการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม จะเอื้ออำนวยต่อการเจริญของแบคทีเรียนี้และก่อให้เกิดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก

สำหรับตัวอย่างปลากะตักที่เน่าเสียที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมงนั้น รวบรวมไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลท และพบ 17 ไอโซเลทที่สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ (ตารางที่ 3.2) จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกโดยใช้อาหาร PCA และ TCBS ทุกไอโซเลทมีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ (ตารางที่ 3.3) ผลการระบุชนิดพบว่าทุกไอโซเลทมีความเหมือนกับ *M. morganii* ในระดับ 99.9% ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *M. morganii* เป็นประชากรส่วนใหญ่ของแบคทีเรียในปลากะตักที่เน่าเสีย

และอาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่มีบทบาทต่อการสะสมไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก Rodtong et al. (2005) สามารถคัดแยก *M. morganii* จากปลากะตักที่เน่าเสียที่ 35°ซ นอกจากนี้ Ababouch et al. (1991) รายงานว่า *M. morganii* เป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงที่สุดที่คัดแยกจากปลาซาร์ดีนที่เน่าเสียที่ 25°ซ

แบคทีเรียที่คัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียที่ 0°ซ เป็นเวลา 13 วัน มีทั้งที่มีรูปร่างเซลล์กลมแกรมบวก และรูปร่างเซลล์เป็นท่อนแกรมลบ (ตารางที่ 3.3) แบคทีเรียรูปร่างเซลล์กลม 1 ไอโซเลท มีความเหมือนของสมบัติทางชีวเคมีกับ *Staphylococcus aureus* 77.7% ส่วนที่มีรูปร่างเซลล์ท่อนมีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* 86.7 % โดยแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทคัดแยกได้จากอาหาร PCA และ PI ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม psychrophiles ที่สามารถระบุชนิดได้คือ *Pseudomonas putida* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งคัดแยกจากที่แยกเชื้อด้วยอาหาร PCA เห็นได้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียในน้ำแข็งมีความหลากหลายของกลุ่มและชนิด Ryser et al. (1984) พบแบคทีเรียในกลุ่ม psychrophiles ที่มีบทบาทต่อการสร้างฮีสตามีนในปลาทูน่าคือ *P. putida* และ *P. fluorescens* นอกจากนี้ Lakshmanan et al. (2002) รายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่มักพบในระยะหลังของการเน่าเสียของปลาและกุ้งในน้ำแข็ง อย่างไรก็ตาม Sato et al. (1995) ศึกษาการเกิดและการสลายของฮีสตามีนในปลา common mackerel และพบว่า *P. putida* เป็นแบคทีเรียที่พบในระยะหลังของการเน่าเสียที่อุณหภูมิต่ำ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายฮีสตามีนได้

การสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้ แสดงในตารางที่ 3.4 จะเห็นได้ว่า *M. morganii* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุด โดยสายพันธุ์ที่คัดแยกจากปลากะตักที่เน่าเสียสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดถึง 174.6 มก./100 มล. นอกจากนี้ *M. morganii* ยังเป็นแบคทีเรียที่สร้างพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีน โดยสามารถสร้างได้สูงสุด 258.3 และ 19.6 มก./100 มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4) ในขณะที่ไทรามีนเกิดขึ้นในปริมาณที่ไม่สูงนัก (อยู่ได้ในช่วง 2.1-7.3 มก./100 มล.) เมื่อเทียบกับไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ โดย จึงอาจกล่าวได้ว่า *M. morganii* มีบทบาทสำคัญไม่เฉพาะต่อการสร้างฮีสตามีน แต่สามารถสร้างพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนในระดับสูงในอาหารเหลว Moller ดังนั้น *M. morganii* จึงเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด คือ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีน ในปลากะตักที่เน่าเสีย เมื่อพิจารณาการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักที่เน่าเสีย (ตารางที่ 3.1) พบว่า ฮีสตามีน

พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และไทรามีน เป็นไบโอจีนิกเอมีนสำคัญในปลากะตักที่เน่าเสียที่ 25°ซ ในขณะที่ฮีสตามีนเป็นเพียงไบโอจีนิกเอมีนหลักในปลากะตักที่เน่าเสียในน้ำแข็ง ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของ *M. morganii* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ *M. morganii* ที่แยกได้จากปลาเน่าเสียที่ 25°ซ สามารถสร้างพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และฮีสตามีน ได้สูง ในขณะที่สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากปลากะตักเน่าเสียในน้ำแข็งสร้างฮีสตามีนเป็นหลักเท่านั้น และยังสร้างฮีสตามีนได้น้อยกว่าสายพันธุ์ที่คัดแยกจากปลาที่เน่าเสียที่ 25°ซ แม้ว่าปลากะตักที่เน่าเสียที่ 25°ซ (ตารางที่ 3.4) จะมีปริมาณไทรามีนที่สูงคือ 86.7 มก./100 มล.(ตารางที่ 3.1) แต่การสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว Moller ของ *M. morganii* มีปริมาณไม่สูงนัก (2.1-7.3 มก./100 มล.) ทั้งนี้เนื่องจากอาหาร Niven ที่ใช้ในการคัดเลือกขั้นต้นนั้น เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของฮีสติดีนเท่านั้นมิได้มีส่วนผสมของกรดอะมิโนอื่นๆ ที่เป็นสารตั้งต้นของไบโอจีนิกเอมีน เชื้อซึ่งสร้างไทรามีนได้สูงแต่ไม่สร้างฮีสตามีนอาจไม่ถูกคัดเลือก หรืออาจเป็นไปได้ว่าไทโรซีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไทรามีนมีความสามารถในการละลายต่ำ เนื่องจากพบตะกอนไทโรซีนในอาหาร Moller อาจส่งผลให้ไทรามีนเกิดขึ้นได้น้อยในระบบอาหารเหลว แม้ว่าเชื้อนี้อาจสามารถสร้างเอนไซม์ไทโรซีนดีคาร์บอกซิเลสก็ตาม สำหรับในตัวอย่างปลา เมื่อเกิดการเน่าเสีย จะเกิดการย่อยสลายโปรตีนเป็นเพปไทด์และกรดอะมิโนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าในระบบอาหารเหลว

จากตารางที่ 3.4 จะเห็นได้ว่า *M. morganii* มีความสามารถในการสร้างพิวเทรสซีนได้สูงในอาหารเหลว Moller โดยสามารถสร้างได้มากกว่าฮีสตามีน แต่ในตัวอย่างปลากะตักกลับพบปริมาณพิวเทรสซีนต่ำกว่าฮีสตามีน (ตารางที่ 3.1) กรดอะมิโนอาร์จินีนจะถูกเปลี่ยนเป็นออร์นิธีนโดยเอนไซม์อาร์จิเนส (Arginase) และออร์นิธีนนี้จะเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ออร์นิธีนดีคาร์บอกซิเลสและได้ผลิตภัณฑ์พิวเทรสซีน จะเห็นได้ว่าการสะสมของพิวเทรสซีนจำเป็นต้องมีออร์นิธีน ซึ่งในการทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียโดยใช้อาหาร Moller นั้นมีปริมาณออร์นิธีนอย่างเพียงพอ แต่ในการเน่าเสียของปลากะตักปริมาณออร์นิธีนอาจเกิดขึ้นอย่างจำกัด เป็นผลให้ปริมาณพิวเทรสซีนเกิดน้อยกว่าฮีสตามีน ความเป็นไปได้อีกประการหนึ่งคือพิวเทรสซีนที่เกิดขึ้นในปลากะตักอาจย่อยสลายโดยเอนไซม์ amine oxidase ซึ่งเอนไซม์นี้ผลิตจากแบคทีเรียและสามารถย่อยสลายไบโอจีนิกเอมีนได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการปนเปื้อนของ *M. morganii* ไม่เพียงแต่จะก่อให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนเท่านั้น แต่ยังสามารถก่อให้เกิดการสะสมของพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนในปลากะตัก ซึ่งไบโอจีนิกเอมีนสองชนิดหลังนี้สามารถเพิ่มความเป็นพิษของฮีสตามีนได้

ตารางที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และผลการระบุชนิด/สายพันธุ์ ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลากะตักจำนวน 17 ไอโซเลท

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/ size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
F	PI	19	-	Rods/ 0.5-0.6 X1.0-1.2	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
		20	-	Rods/ 0.3-0.5 x 1.0-1.2	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
		22	-	Rods/ 0.6-0.8 x1.2-1.7	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
	PCA(Psy)	54	+	Rods/ 0.1-0.2 x 1.5-2.0	-	+	S+/S+	-	+	-	-	-	NI	-
RT/16h	PCA	3	-	Rods/ 0.4-0.5 x 1.0-1.8	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
		13	-	Rods/ 0.4-0.7 x 1.1-1.9	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
	TCBS	15	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.6-0.8	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/ size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
RT/16h	TCBS	32	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.6-0.8	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
		33	-	Rods/ 0.4-0.6 x 0.7-0.8	-	+	+/+	++	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
		35	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.6-0.9	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
		36	-	Rods/ 0.4-0.7 x 0.8-1.3	-	+	+/+	++	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
0 °C/ 13d	PCA	3	+	Cocci/ 0.4-0.8	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus aureus*	77.7
		9	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.7-1.2	+	+	+/+	++	+	13	11	-	*Morganella morganii*	99.9
	PI	18	-	Rods/ 0.4-0.6 x 0.9-1.2	+	-	+/+	++	+	11	10	-	NI	-

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/ size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
0 °C/ 13d	PI	19	-	Rods/ 0.4-0.5 x 0.8-0.9	+	+	+/+	-	-	-	-	-	*Pseudomonas aeruginosa*	86.7
	PCA(Psy)	39	-	Rods/ 0.1-0.2 x1.4-1.7	+	+	+/-	-	-	-	-	-	*Pseudomonas putida*	94.8
		41	-	Rods/ 0.1-0.2 x 1.5-1.9	+	+	+/-	-	-	-	-	-	*Pseudomonas fluorescens*	99.8

[a]API system (API 20NE identification system for non-enteric Gram-negative rods, API 20E identification system for *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative rods, and API Staph system for identification of genera Staphylococcus and Micrococcus)

S+ = Slightly positive

NI = Not identified.

แบคทีเรียชนิดอื่นที่คัดแยกจากปลากะตัก โดยทั่วไปสร้างฮีสตามีนน้อยกว่า *M. morganii* แต่แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งจัดเป็น psychrophiles แสดงความสามารถในการผลิตพิวเทรสซีนได้สูง (184.4 มก./100 มล., ตารางที่ 3.4) Ö zogul and Ö zogul (2005) รายงานว่าประชากรแบคทีเรียประมาณ 20% ในปลา herring สดและเน่าคือ *Pseudomonas* spp. โดยพบ *P. fluorescens* และ *P. putida* เพียง 3 % ของประชากรแบคทีเรียที่แยกได้ โดย *P. fluorescens* และ *P. putida* สร้างฮีสตามีนได้น้อยคือประมาณ 1 มก./100 มล. เท่านั้น และสร้างพิวเทรสซีนในอาหารเหลวที่เติมออร์นิธีนได้ประมาณ 2.5 มก./100 มล. ซึ่งจัดว่าน้อยกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น Ryser et al. (1984) พบแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads ในปลาทูน่าสด โดยพบว่า *P. fluorescens* และ *P. putida* ที่คัดแยกได้สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในระดับ 0.2-1.7 มก./100 มล. ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า *P. fluorescens* และ *P. putida* จัดเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้น้อย แต่ *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสะสมพิวเทรสซีน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักเก็บในน้ำแข็ง พบว่าไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญคือฮีสตามีน ส่วนพิวเทรสซีนมีปริมาณต่ำ (1.7 มก./100 มล.) ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับสารตั้งต้นออร์นิธีนที่อาจมีในปริมาณจำกัดในเนื้อปลากะตัก แม้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในปลากะตักเน่าเสียในน้ำแข็งจะสร้างฮีสตามีนได้ไม่สูงนักในอาหารเหลว (ตารางที่ 3.4) แต่การเก็บปลาไว้เป็นเวลานาน (13 วัน) จะมีความเสี่ยงสูงต่อการสะสมของฮีสตามีนเช่นกัน

ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้าน

ไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญในปลาร้าได้แก่ ฮีสตามีนและไทรามีน ในขณะที่พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีนมีปริมาณที่น้อยกว่าและมีความผันแปรในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาค่อนข้างสูง ทริปทามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่มีปริมาณต่ำ และไม่พบทั้งสเปอร์มีนและสเปอร์มิดีน (ตาราง 3.5) มาตรฐานความปลอดภัยทางด้านอาหารของประเทศสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรปกำหนดให้ ปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลา และปลาหมักดองต้องไม่สูงเกิน 5 และ 10 มก./100 ก. หากใช้มาตรฐานดังกล่าว จะมีผลิตภัณฑ์ปลาร้าเพียง 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด 6 ตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์มาตราฐาน (< 10 มก./100 ก.) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PR5 และ PR6 ซึ่งผลิตจากปลากระดี่ และปลาช่อน ตามลำดับ เป็นที่เข้าใจกันว่าปลาร้ามักนิยมทำจากปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีความสุ่มเสี่ยงต่อการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีนต่ำ เนื่องจากปลาเหล่านี้มีปริมาณกรดอะมิโนฮีสติดีนอิสระน้อย อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผู้ผลิตกล่าวอ้างว่าใช้วัตถุดิบ "ปลารวม" ในตัวอย่าง PR1 และ PR2 มีค่าฮีสตามีน พิวเทรสซีนและไทรามีนสูง แม้กระทั่งตัวอย่างที่ผลิตจากปลาตะเพียน (PR3) ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าเป็นปลาที่สุ่มเสี่ยงต่อการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนก็มีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิดสูงเกินค่ามาตรฐาน นอกจากนี้ปลาจ่อม

ตารางที่ 3.4 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่คัดแยกจากปลาทะตัก

Sample	Isolation medium	Number of isolate	Species	Biogenic amine content (mg/100 mL)						
				Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
F	PI	3	*Morganella morganii*	ND	2.21±0.13 - 161.82±1.02	2.12±0.08 - 10.38±0.06	27.96±3.90 - 64.98±0.01	2.10±0.08 - 4.08±1.58	ND	ND
RT/16 h	PI,TCBS	3,4	*Morganella morganii*	ND	155.91±2.40 - 258.31±3.70	9.25±0.08 - 19.55±0.50	86.33±2.68 - 174.55±2.60	2.90±0.02 - 6.11±0.21	ND	ND
0 °C/13 d	PCA	1	*Staphylococcus aureus*	ND	ND	ND	34.46±0.17	9.6±0.58	ND	ND
	PCA	1	*Morganella morganii*	ND	1.82±0.84	2.62±0.25	21.93±2.34	7.33±0.19	ND	ND
	PI	1	*Pseudomonas aeruginosa*	ND	ND	ND	27.23±1.29	8.63±0.61	ND	ND
	PCA(Psy)	1	*Pseudomonas putida*	ND	ND	ND	11.02±5.26	ND	ND	ND
	PCA(Psy)	1	*Pseudomonas fluorescens*	ND	184.37±10.73	2.09±0.01	13.21±0.38	ND	ND	ND

ND = Not detected.

ตารางที่ 3.5 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านแบบเค็ม

Sample	Brand	Type of fish used as a raw material	Biogenic amine content (mg/100g)						
			Tryptamine	Putrescine	Cadavarine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
Pla-ra	PR1	Mixed species	ND	17.45 ± 2.27	12.49 ± 1.49	21.50 ± 1.34	57.37 ± 6.37	ND	ND
	PR2	Mixed species	ND	11.10 ± 0.49	12.91 ± 0.55	15.01 ± 0.78	36.54 ± 1.24	ND	ND
	PR3	Barb	ND	16.61 ± 2.28	11.56 ± 1.55	24.08 ± 4.51	36.09 ± 5.16	ND	ND
	PR4	Gourami	8.04 ± 3.40	5.67 ± 1.05	21.91 ± 4.11	11.14 ± 2.64	24.92 ± 6.09	ND	ND
	PR5	Gourami	3.92 ± 0.08	4.10 ± 0.76	11.30 ± 2.30	6.58 ± 1.90	11.81 ± 1.92	ND	ND
	PR6	Snake head	7.78 ± 3.50	2.20 ± 0.81	7.02 ± 2.63	0.90 ± 0.81	6.56 ± 2.06	ND	ND
Pla-jao	PJA1	NA	3.02 ± 0.58	0.96 ± 0.50	1.77 ± 0.31	1.09 ± 0.01	ND	ND	ND
Pla-jom	PJO1	NA	ND	ND	0.44 ± 0.14	43.35 ± 1.71	16.88 ± 0.31	ND	ND

ND = Not detected.

NA = Not available.

เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณฮีสตามีนและไทรามีนที่สูงมากเช่นกัน ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมักในกลุ่มปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการสะสมของฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆเกินค่ามาตรฐานสากล ซึ่งมีแนวโน้มที่จะทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ และเมื่อพิจารณาประเด็นความปลอดภัยทางด้านอาหารจะพบว่าผลิตภัณฑ์ปลาร้ามีความเสี่ยงสูงกว่าผลิตภัณฑ์จากน้ำปลา เนื่องจากหน่วยบริโภค (Serving size) สูงกว่าน้ำปลามาก นอกจากวัตถุดิบแล้ว การสะสมของปริมาณไบโอจีนิกเอมีนอาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก การศึกษาเพื่อหาสาเหตุของปัญหาการสะสมไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาร้าว่าเกิดจากวัตถุดิบ หรือกระบวนการหมักจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการยกมาตรฐานการผลิตและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ปลาร้า

แหนมปลาหรือส้มฟักเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลาย ไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญในผลิตภัณฑ์แหนมปลาคือ พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน ฮีสตามีน และไทรามีน (ตารางที่ 3.6) และไม่พบทริปทามีน สเปอร์มีนและสเปอร์มิดีน ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิดมีความผันแปรสูงระหว่างตัวอย่าง ปริมาณฮีสตามีนสูงสุดที่ตรวจพบคือ 43.4 มก./100 ก. ซึ่งมีค่าสูงเกินมาตรฐานของ

ตารางที่ 3.6 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์แหนมปลาจากแหล่งผู้ผลิตต่างๆ

Sample	Biogenic amine content (mg/100g)						
	Tryptamine	Putrescine	Cadavarine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
NP1	ND	7.778 ± 0.03	5.10 ± 0.06	3.19 ± 0.16	9.81 ± 0.16	ND	ND
NP2	ND	51.55 ± 1.67	0.53 ± 0.03	ND	24.66 ± 0.32	ND	ND
NP3	ND	ND	0.44 ± 0.14	43.35 ± 1.71	16.88 ± 0.31	ND	ND
NP4	ND	32.50 ± 1.49	16.89 ± 0.86	24.10 ± 0.93	9.76 ± 0.50	ND	ND
NP5	ND	0.52 ± 0.05	1.07 ± 0.43	0.35 ± 0.35	6.92 ± 1.26	ND	ND
NP6	ND	7.55 ± 0.71	9.62 ± 0.81	7.74 ± 0.86	6.53 ± 0.15	ND	ND
NP7	ND	28.81 ± 5.08	23.38 ± 4.08	ND	7.51 ± 0.77	ND	ND
NP8	ND	22.75 ± 1.32	12.84 ± 0.30	20.33 ± 0.73	14.49 ± 0.67	ND	ND
NP9	ND	11.53 ± 0.14	7.30 ± 0.45	ND	8.44 ± 0.95	ND	ND
NP10	ND	1.07 ± 0.07	0.76 ± 0.06	ND	6.94 ± 0.22	ND	ND
NP11	ND	0.73 ± 0.16	3.72 ± 0.00	9.62 ± 0.41	9.32 ± 0.64	ND	ND
NP12	ND	4.01 ± 0.06	11.46 ± 0.04	ND	10.13 ± 0.47	ND	ND
NP13	ND	3.22 ± 0.15	1.40 ± 0.01	0.67 ± 0.04	5.51 ± 0.16	ND	ND

ND = Not detected.

ประเทศสหรัฐอเมริกาถึง 8 เท่า ดังนั้นตัวอย่างนี้จึงไม่เหมาะแก่การบริโภค ปริมาณพิวเทรสซีนสูงสุดที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ NP2 คือ 51.6 มก./100 ก. และมีปริมาณไทรามีนสูงสุด คือ 24.7 มก./100 ก อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์นี้ ไม่พบฮีสตามีน โดยปกติแล้วพิวเทรสซีนและไทรามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบในตัวอย่างที่มีการเน่าเสีย อาจสันนิษฐานได้ว่าวัตถุดิบที่นำมาผลิตผลิตภัณฑ์ NP2 อาจมีคุณภาพความสดต่ำ ในบางตัวอย่าง (NP4, NP8) พบทั้งพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน ฮีสตามีนและไทรามีน ในปริมาณที่สูงใกล้เคียงกัน

ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในปลาส้มมีลักษณะคล้ายคลึงกับแหนมปลาดังแสดงในตารางที่ 3.7 ปริมาณไบโอจีนิกมีความแปรผันสูงในแต่ละตัวอย่าง โดยไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญคือ คาดาเวอรีนซึ่งพบปริมาณสูงสุดคือ 22.8 มก./100 ก. ในตัวอย่าง PS3 ซึ่งผลิตจากปลาตะเพียน นอกจากนี้ยังตรวจพบฮีสตามีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน โดยปริมาณฮีสตามีนที่ตรวจพบมีค่าน้อยกว่า 5 มก./100 ก. ซึ่งจัดว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ปลา ยกเว้นตัวอย่าง PS12 ที่ผลิตจากปลายี่สกเทศซึ่งมีปริมาณฮีสตามีนสูงถึง 42.1 มก./100 ก. และยังมีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเกือบทุกชนิดรวมถึงคาดาเวอรีน พิวเทรสซีน ไทรามีนและทริปทามีนสูงเกินค่ามาตรฐาน (5 มก./100 ก.) และเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก2 ชนิดข้างต้น ปลาส้มมีปริมาณทริปทามีน สเปอร์มีนและสเปอร์มิดีนน้อยกว่าไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น

ปลาอินทรีย์และปลาทูเป็นปลาที่สุ่มเสี่ยงต่อการสะสมของฮีสตามีน เนื่องจากเป็นปลาที่มีกรดอะมิโนอิสระฮีสติดีนในกล้ามเนื้อสูง จากการศึกษาพบว่าไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญในปลาอินทรีย์เค็มคือ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และ ไทรามีน (ตารางที่ 3.8) ในขณะที่ปลาทูเค็มมีการสะสมของฮีสตามีนสูงกว่าไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีปริมาณฮีสตามีนสูงเกินมาตรฐานสากล (5-10 มก./100 ก.) โดยในปลาอินทรีย์เค็มมีปริมาณฮีสตามีนสูงสุดถึง 46 มก./100 ก. (ตารางที่ 3.8) และมีปริมาณคาดาเวอรีนสูงมากในช่วง 112.9-155.4 มก./100 ก. หากพิจารณาถึงความปลอดภัยทางด้านอาหารในประเด็นของสารไบโอจีนิกเอมีน จะเห็นได้ว่าตัวอย่างปลาอินทรีย์เค็มนั้นอาจไม่เหมาะแก่การบริโภค และไม่สามารถส่งออกได้ นอกจากนี้ทุกตัวอย่างของปลาทูเค็มมีปริมาณฮีสตามีนสูงใกล้เคียงกันคือ 42.1-46.4 มก./100 ก. ผลิตภัณฑ์ปลาดองเค็มทั้งสองชนิดเป็นแหล่งสะสมของไบโอจีนิกเอมีนซึ่งมีปริมาณสูงมากที่จะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้

แม้ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนจะมีความแตกต่างกันแต่ละตัวอย่าง แต่เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมี-กายภาพ พบว่ากลุ่มผลิตภัณฑ์เดียวกันมีค่าใกล้เคียงกัน (ตาราง 3.9) ปลาร้าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเกลือสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดอื่นที่ศึกษา โดยมีค่าเฉลี่ยที่ 16.2% แหนมปลาและปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่แบคทีเรียกรดแล็กติกมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ

หมัก และผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวอย่างเด่นชัด ดังนั้นผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ประเภทจึงมีความเป็นกรดสูงและมีค่า pH ที่ค่อนข้างต่ำ แม้รสเปรี้ยวจะไม่ใช่ลักษณะที่เด่นชัดในผลิตภัณฑ์ปลาร้าเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรสเค็ม แต่ผลิตภัณฑ์ปลาร้าก็มีปริมาณกรด และค่า pH ที่ใกล้เคียงกับปลาส้ม อันเป็นผลมาจากกระบวนการหมัก การแตกสลายของโปรตีนเป็นเพปไทด์และแอมโมเนียในระหว่างกระบวนการดองเค็มของปลาอินทรีย์และปลาอินทรีย์เค็มเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีค่า pH ที่สูงกว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมักประเภทอื่น จะสังเกตเห็นได้ว่าคุณสมบัติทางเคมีกาย-ภาพเหล่านี้ไม่สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ศึกษาได้ และมิได้บ่งชี้สุขลักษณะของวัตถุดิบ และกระบวนการผลิตแต่อย่างใด รวมถึงไม่ได้บ่งชี้ถึงความปลอดภัยด้านอาหารของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นในการกำหนดกรอบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์เหล่านี้โดยใช้เพียงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ จึงไม่น่าที่จะเพียงพอ ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของผลิตภัณฑ์น่าจะเป็นดัชนีทางเคมีที่สามารถจัดจำแนกคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้

ตารางที่ 3.7 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

Sample	Fish used as a raw material	Biogenic amine content (mg/100g)						
		Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
PS1	Striped catfish	ND	14.70 ± 0.11	12.21 ± 0.13	ND	3.91 ± 0.02	ND	ND
PS2	Barb	ND	7.51 ± 2.13	15.33 ± 3.79	6.40 ± 2.07	1.37 ± 0.74	ND	ND
PS3	Barb	ND	8.64 ± 0.68	22.83 ± 1.13	7.60 ± 0.55	7.55 ± 0.31	ND	ND
PS4	Barb	ND	7.41 ± 0.09	18.09 ± 0.19	1.48 ± 0.04	11.98 ± 0.08	ND	ND
PS5	Barb	ND	0.22 ± 0.02	1.95 ± 0.06	ND	3.12 ± 0.09	ND	ND
PS6	Barb	ND	012 ± 0.009	8.1 ± 0.15	ND	2.75 ± 0.71	ND	ND
PS7	Barb	ND	4.97 ± 0.03	17.91 ± 0.09	ND	5.12 ± 0.32	ND	ND
PS8	Barb	ND	3.27 ± 0.02	14.61 ± 0.05	ND	4.42 ± 0.45	ND	ND
PS9	Giant Snake head	ND	4.06 ± 0.05	0.45 ± 0.21	1.80 ± 0.16	6.29 ± 0.08	ND	0.92 ± 0.16
PS10	Giant Snake head	ND	4.62 ± 0.46	ND	2.15 ± 0.20	7.50 ± 0.38	ND	1.02 ± 0.01
PS11	Carp	ND	9.57 ± 0.39	5.68 ± 0.25	9.60 ± 0.43	6.93 ± 0.33	ND	ND
PS12	Rohu	10.60 ± 0.04	53.78 ± 2.11	17.01 ± 1.22	42.13 ± 2.55	15.30 ± 1.62	ND	ND

ND = Not detected.

ตารางที่ 3.8 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม

Sample	Brand	Biogenic amine content (mg/100g)						
		Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
Salted Spanish mackerel	SSM1	10.84 ± 0.49	22.13 ± 1.52	144.09 ± 9.77	46.27 ± 4.41	0.82 ± 0.01	ND	ND
	SSM2	12.93 ± 1.81	23.34 ± 0.54	112.97 ± 2.85	27.77 ± 3.96	12.23 ± 0.14	ND	ND
	SSM3	ND	23.44 ± 0.32	155.38 ± 5.33	33.05 ± 6.63	14.01 ± 0.10	ND	ND
Salted mackerel	SM1	ND	1.17 ± 0.19	5.39 ± 0.54	42.11 ± 3.18	6.03 ± 0.36	0.76 ± 0.07	ND
	SM2	ND	1.30 ± 0.05	9.88 ± 0.56	46.35 ± 1.92	10.17 ± 0.31	0.41 ± 0.01	ND

ND = not detected.

ตารางที่ 3.9 สมบัติทางเคมี-กายภาพในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้าน

Samples	Number of samples	Salt (%)	Acidity (%)	Aw	pH
Pla-ra	8	16.24 ± 2.02	1.68 ± 0.03	0.839 ± 0.09	5.39 ± 0.44
Pla-som	12	3.87 ± 1.17	1.87 ± 0.16	0.899 ± 0.06	5.24 ± 0.32
Nham-pla	13	1.93 ± 0.84	2.08 ± 0.29	0.896 ± 0.05	4.93 ± 0.39
Salted Spanish mackerel	3	10.09 ± 0.05	ND	0.853 ± 0.03	6.30 ± 0.12
Salted mackerel	2	14.07 ± 1.35	ND	0.848 ± 0.04	7.07 ± 0.06

ND= Not detected.

สมบัติทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ก. ปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม

จากการตรวจนับจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน พบจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจนับโดยใช้อาหาร PCA โดยเฉลี่ยจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาร้า 6 ตัวอย่าง จำนวนแบคทีเรีย 1.54 LogCFU/g ในปลาเจ่าและปลาจ่อมมีจำนวน 1.20 และ 1.92 LogCFU/g ตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้อาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% พบจำนวนแบคทีเรียที่มากกว่าคือในผลิตภัณฑ์ปลาร้าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.75 LogCFU/g ในปลาเจ่าและปลาจ่อมมีจำนวน 1.30 และ 2.07 LogCFU/g ตามลำดับ บ่งชี้ถึงปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่มที่ชอบเกลือทนเกลือในระดับปานกลาง (Moderately halophilic/halotolerant bacteria) ในผลิตภัณฑ์ปลาร้า สำหรับการตรวจหาแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ พบแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads และ Enterobacteriaceae โดยประมาณ 1 LogCFU/g ในบางตัวอย่างเท่านั้น ไม่พบกลุ่ม vibrios ในผลิตภัณฑ์ปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม อาจเนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มหลังไม่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือสูง (16% NaCl) แต่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลาง (Moderately halophilic/halotolerant lactic acid bacteria) ในผลิตภัณฑ์ปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม จำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกโดยเฉลี่ยเมื่อตรวจนับโดยใช้อาหาร MRS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% เท่ากับ 2.35, 1.19 และ 1.70 LogCFU/g ตามลำดับ ซึ่งเป็นจำนวนที่มากกว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ (ตารางที่ 3.10)

ตารางที่ 3.10 จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม ที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Samples	Replication	Bacterial counts (Log CFU/g) using different media						
		PCA	TSA (+10% NaCl)	PI	TCBS	VRBG	MRS	MRS (+10% NaCl)
Pla-ra	PR1	1.04 ± 0.06	1.25 ± 0.03	1.87 ± 0.06	ND	ND	2.50 ± 0.05	2.56 ± 0.03
	PR2	1.01 ± 0.23	1.58 ± 0.06	1.93 ± 0.01	ND	ND	2.48 ± 0.05	2.56 ± 0.01
	PR3	1.46 ± 0.22	1.29 ± 0.02	1.06 ± 0.03	ND	1.36 ± 0.00	2.16 ± 0.14	2.04 ± 0.01
	PR4	1.94 ± 0.12	2.50 ± 0.02	ND	ND	ND	ND	2.71 ± 0.06
	PR5	1.92 ± 0.11	1.59 ± 0.07	ND	ND	ND	ND	2.39 ± 0.06
	PR6	1.87 ± 0.13	2.27 ± 0.03	ND	ND	ND	ND	1.83 ± 0.08
Pla-Jao	PJA1	1.20 ± 0.17	1.30 ± 0.06	ND	ND	ND	0.69± 0.12	1.19 ± 0.06
Pla-Jom	PJO1	1.92 ± 0.03	2.07 ± 0.04	ND	ND	ND	ND	1.70 ± 0.11

ND= Not detected.

ข. แหนมปลา

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจนับในแหนมปลาโดยใช้อาหาร PCA โดยเฉลี่ยจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 13 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.11) มีจำนวน 2.11 LogCFU/g ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกับที่พบเมื่อใช้อาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% (1.94 LogCFU/g โดยเฉลี่ย) แต่แบคทีเรียกลุ่มหลักในผลิตภัณฑ์แหนมปลาคือแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ตรวจนับด้วยอาหาร MRS ซึ่งมีจำนวนโดยเฉลี่ยประมาณ 2.30 LogCFU/g แต่เมื่อตรวจนับโดยใช้อาหาร MRS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% พบโดยเฉลี่ยเพียง 1.48 LogCFU/g (ตารางที่ 3.11) เนื่องจากปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์ประเภทนี้มีค่าไม่เกิน 2% ซึ่งไม่เพียงพอต่อการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads, vibrios และ Enterobacteriaceae จึงมีหลายตัวอย่างที่ตรวจพบแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าว ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads และ Enterobacteriaceae นั้นมักเกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลาและสุขลักษณะอนามัยในการผลิต

ตารางที่ 3.11 จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์แหนมปลาที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Sample	Bacterial counts (Log CFU/g) using different media						
	PCA	TSA (+10% NaCl)	PI	TCBS	VRBG	MRS	MRS (+10% NaCl)
NP1	2.02 ± 0.01	1.91 ± 0.03	2.22 ± 0.08	2.16 ± 0.04	1.70 ± 0.10	2.45 ± 0.02	2.49 ± 0.00
NP2	2.04 ± 0.00	2.19 ± 0.04	1.17 ± 0.12	1.21 ± 0.09	0.78 ± 0.01	2.26 ± 0.04	0.63 ± 0.21
NP3	2.3 1± 0.00	2.12 ± 0.10	2.06 ± 0.08	0.86 ± 0.36	1.07 ± 0.16	1.77 ± 0.03	0.45 ± 0.21
NP4	1.90 ± 0.02	1.99 ± 0.04	ND	ND	ND	1.58 ± 0.10	1.49 ± 0.02
NP5	2.14 ± 0.02	2.00 ± 0.05	ND	ND	ND	2.75 ± 0.10	1.67 ± 0.01
NP6	2.07 ± 0.12	2.21 ± 0.01	1.71 ± 0.14	ND	1.66 ± 0.07	2.67 ± 0.02	1.67 ± 0.01
NP7	2.44 ± 0.01	1.92 ± 0.02	1.56 ± 0.09	ND	2.15 ± 0.12	2.66 ± 0.02	1.79 ± 0.01
NP8	2.71 ± 0.05	1.81 ± 0.00	2.49 ± 0.04	2.66 ± 0.03	2.64 ± 0.04	2.57 ± 0.05	0.87 ± 0.04
NP9	2.11 ± 0.09	1.87± 0.12	1.60 ± 0.03	2.04 ± 0.00	1.84 ± 0.03	2.51 ± 0.03	1.64 ± 0.12
NP10	1.86 ± 0.09	1.68± 0.03	2.48± 0.10	1.22 ± 0.02	1.48 ± 0.01	1.71± 0.10	1.74 ± 0.01
NP11	1.87 ± 0.11	1.58 ± 0.13	1.63 ± 0.03	ND	ND	2.16 ± 0.03	1.29 ± 0.02
NP12	2.41 ± 0.02	1.90 ± 0.05	ND	0.94 ± 0.14	1.27 ± 0.05	2.13± 0.02	2.06 ± 0.18
NP13	1.56 ± 0.09	2.03 ± 0.11	1.62 ± 0.09	1.81 ± 0.05	1.52 ± 0.04	2.70 ± 0.08	1.49 ± 0.02

ND = Not detected.

ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเกลือต่ำ แบคทีเรียจากการปนเปื้อนหรือจากวัตถุดิบที่ไม่สดยังสามารถดำรงอยู่ได้ แต่อาจไม่ได้เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเนื่องจากค่า pH ของผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างต่ำ

ค. ปลาส้ม

กลุ่มของแบคทีเรียที่พบในปลาส้มคล้ายคลึงกับในผลิตภัณฑ์แหนมปลา จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจนับในปลาส้มโดยใช้อาหาร PCA โดยเฉลี่ยจากผลิตภัณฑ์ 13 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.12) มีจำนวน 2.17 LogCFU/g ซึ่งมีจำนวนมากกว่าที่พบเมื่อใช้อาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% (1.76 LogCFU/g โดยเฉลี่ย) แบคทีเรียกลุ่มหลักในผลิตภัณฑ์ปลาส้มคือแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลาง (Moderately halophilic/halotolerant lactic acid bacteria) ที่ตรวจนับด้วยอาหาร MRS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% ซึ่งมีจำนวนโดยเฉลี่ยประมาณ 2.27 LogCFU/g มากกว่าที่พบจากตรวจนับโดยใช้อาหาร MRS (1.48 LogCFU/g โดยเฉลี่ย) (ตารางที่ 3.11) นอกจากนี้ยังตรวจพบ

ตารางที่ 3.12 จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Sample	Bacterial counts (Log CFU/g) using different media						
	PCA	TSA (+10% NaCl)	PI	TCBS	VRBG	MRS	MRS (+10% NaCl)
PS1	2.06 ± 0.01	1.76 ± 0.11	0.84 ± 0.09	0.95 ± 0.07	ND	2.19 ± 0.04	2.08 ± 0.09
PS2	2.05 ± 0.01	1.70 ± 0.03	1.76 ± 0.04	ND	2.27 ± 0.04	1.68 ± 0.03	2.11± 0.01
PS3	2.50 ± 0.01	0.74 ± 0.06	1.65 ± 0.12	0.89 ± 0.16	1.06 ± 0.08	1.81 ± 0.03	1.91 ± 0.08
PS4	2.24 ± 0.03	1.04 ± 0.19	2.01± 0.04	0.93 ± 0.21	2.07 ± 0.05	1.92 ± 0.07	2.28 ± 0.01
PS5	2.02 ± 0.16	2.60 ± 0.04	2.03 ± 0.02	1.63 ± 0.07	2.20 ± 0.04	2.14 ± 0.04	1.84 ± 0.04
PS6	2.01 ± 0.02	1.92 ± 0.06	2.02 ± 0.05	ND	0.69 ± 0.12	2.28 ± 0.09	2.23 ± 0.00
PS7	1.87 ± 0.02	2.60± 0.01	2.49 ± 0.07	ND	2.56 ± 0.03	1.82 ± 0.00	2.39 ± 0.04
PS8	1.84 ± 0.08	1.74 ± 0.06	2.04 ± 0.05	ND	ND	2.20 ± 0.04	2.49 ± 0.01
PS9	1.86 ± 0.05	1.54 ± 0.07	2.23 ± 0.00	ND	0.84 ± 0.09	2.16 ± 0.07	2.46 ± 0.02
PS10	2.42 ± 0.03	1.90 ± 0.02	2.22 ± 0.02	ND	ND	2.52 ± 0.06	2.42 ± 0.04
PS11	2.33 ± 0.04	1.98 ± 0.14	2.01 ± 0.04	ND	ND	2.20 ± 0.02	2.38 ± 0.05
PS12	2.16 ± 0.15	1.92 ± 0.08	1.54 ± 0.10	0.69 ± 0.13	ND	2.39 ± 0.01	2.57 ± 0.04
PS13	2.82 ± 0.02	1.49 ± 0.02	1.84 ± 0.07	ND	1.72 ± 0.06	2.06 ± 0.02	2.41 ± 0.06

ND = Not detected.

แบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads ในทุกตัวอย่าง (1.90 LogCFU/g โดยเฉลี่ย) พบแบคทีเรียในกลุ่ม vibrios ในบางตัวอย่าง และตรวจพบแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในบางตัวอย่าง (ตารางที่ 3.11)

ผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์เบื้องต้นบ่งชี้ว่าทั้งตัวอย่างปลาส้มและแหนมปลามีแนวโน้มของการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads, vibrios และ Enterobacteriaceae ซึ่งเกิดจากการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพความสดต่ำหรืออาจเกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต

ง. ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็ม

ผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มมีปริมาณจุลินทรีย์รวมทั้งหมด ประมาณ 5.30 และ 5.14 Log CFU/g ตามลำดับเมื่อตรวจนับโดยใช้อาหาร PCA ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนที่พบเมื่อใช้อาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% (5.76 และ 5.20 LogCFU/g โดยเฉลี่ยตามลำดับ) (ตารางที่ 3.13) ซึ่งจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ/ทนเค็มในระดับปานกลาง ที่พบในปริมาณมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มที่นำมาศึกษา ในผลิตภัณฑ์สองชนิดนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม pseudomonads โดยเฉลี่ย 2.99 และ 2.65 LogCFU/g ตามลำดับ และพบ vibrios (2.50 LogCFU/g โดยเฉลี่ย) เฉพาะในผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มเท่านั้น (ตารางที่ 3.13) โดยมีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียชอบเกลือ/ทนเกลือ อาจเนื่องจากปริมาณเกลือที่สูงในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จากตัวอย่างที่ทดสอบนี้ตรวจไม่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกและแบคทีเรียกรดแล็กติกชอบเกลือ/ทนเกลือ นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในผลิตภัณฑ์ทั้งสองประเภท กระบวนการผลิตปลาดองเค็มทั้งสองชนิดนี้เป็นการดองเค็มแบบแห้งคือหมักปลาไว้ใต้ชั้นเกลือซึ่งมีความหนา 1-2 นิ้ว ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเช่นในกรณีของปลาร้า ปลาส้ม และแหนมปลา ดังนั้นโอกาสที่แบคทีเรียกรดแล็กติกจะเจริญจึงมีน้อยด้วยปริมาณเกลือที่สูงในระหว่างกระบวนการดองเค็ม จึงเป็นปัจจัยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่ปนเปื้อนได้

ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่ตรวจนับได้ไม่มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียมิได้บ่งชี้ถึงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในทุกผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ศึกษา หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งประชากรแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Finished product) อาจไม่มีบทบาทหลักต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักเหล่านี้

ตารางที่ 3.13 จำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาซูเค็มที่ตรวจนับโดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Sample	Replication	Bacterial counts (Log CFU/g) using different media			
		PCA	TSA (+10% NaCl)	PI	TCBS
Salted Spanish mackerel	SSM-1	5.30 ± 0.03	5.81± 0.04	3.45 ± 0.13	3.41± 0.04
	SSM-2	5.43 ± 0.01	5.72 ± 0.13	2.67 ± 0.13	2.15 ± 0.04
	SSM-3	5.16 ± 0.02	5.74 ± 0.06	2.85 ± 0.12	1.95 ± 0.14
Salted mackerel	SM-1	5.74 ± 0.13	5.73 ± 0.06	2.51 ± 0.07	ND
	SM-2	4.54 ± 0.03	4.67± 0.02	2.78 ± 0.02	ND

ND = Not detected.

การคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตภัณฑ์ปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม

จากจำนวนไอโซเลทที่คัดเลือกจากการตรวจหาจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาร้า ปลาเจ่า และปลาจ่อม 8 ตัวอย่าง ทั้งหมด 214 ไอโซเลท มีเพียง 6 ไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน (ตารางที่ 3.14) หรือคิดเป็นไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนเพียง 3% ของไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกมา จากการศึกษานี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกและกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติดที่ชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลางได้มากที่สุดคือ 93 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.14) ซึ่งคิดเป็น 44% ของไอโซเลททั้งหมด แต่ไม่พบไอโซเลทใดที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สามารถคัดแยกไอโซเลทได้ในอันดับรองลงมาคือ 51 ไอโซเลท แต่สัดส่วนของไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนคิดเป็น 4% เท่านั้น อาหารเลี้ยงเชื้อ PI มีประสิทธิภาพในการคัดแยกเพียง 6% ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+10%NaCl ซึ่งคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลาง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBG สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สัดส่วนสูงสุดคิดเป็น 33% แต่อย่างไรก็ตามจำนวนไอโซเลทที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้น ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลาง รวมถึงแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งเป็นแบคทีเรีย 2 กลุ่มเด่นในผลิตภัณฑ์ปลาร้าไม่ใช่แบคทีเรียที่มีบทบาทในการสร้างไบโอจีนิกเอมีน

สำหรับในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสามารถคัดเลือกไอโซเลทได้ทั้งสิ้น 386 ไอโซเลท และพบไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน 29 ไอโซเลทซึ่งคิดเป็น 8% เท่านั้น ผลการคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนให้ผลในลักษณะเดียวกับในผลิตภัณฑ์ปลาร้าคือ แบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น ไม่พบการสร้างไบโอจีนิกเอมีน (ตารางที่ 3.14) อาหารเลี้ยงเชื้อ PI เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน ส่วนอาหาร PCA มีประสิทธิภาพต่ำในการคัดแยกเชื้อที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน

จากจำนวนไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างปลาส้ม 13 ตัวอย่าง ทั้งหมด 412 ไอโซเลท มีเพียง 39 ไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน ซึ่งคิดเป็น 9.5% อาหารเลี้ยงเชื้อ PI, TCBS และ VRBG สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงกว่าอาหาร PCA และเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์แหนมปลา แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้ไม่สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้

จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม ไม่น่าจะเกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก ทั้งนี้เนื่องจากว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นในกระบวนการหมักปลาทั้ง 3 ชนิดคือแบคทีเรียกรดแล็กติก และแบคทีเรียชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลางในกรณีของปลาร้า แต่แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้มีสัดส่วนที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนน้อยมาก หรือไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนเลย ดังนั้นปริมาณไบโอจีนิกเอมีนที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์น่าจะเกิดขึ้นจากวัตถุดิบซึ่งสอดคล้องกับผลการคัดแยกซึ่งมักพบเชื้อแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ PI, VRBG ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads และ Enterobacteriaceae ตามลำดับ

ตารางที่ 3.14 จำนวนไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และจากการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในขั้นคัดกรองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Niven

Sample	Medium used for bacterial isolation																				
	PCA medium			TSA medium (+ 10 %NaCl)			PI medium			TCBS medium			VRBG medium			MRS agar			MRS agar (+ 10 %NaCl)		
	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former
Pla-ra	51	2	2 (4%)	49	2	2 (4%)	18	1	1 (6%)	0	0	0 (0%)	3	1	1 (33%)	34	0	0 (0%)	59	0	0 (0%)
Nham-pla	82	1	1 (2%)	75	6	6 (8%)	46	13	13 (29%)	36	0	0 (0%)	46	9	9 (20%)	38	0	0	63	0	0 (0%)
Pla-som	102	13	13 (13%)	65	6	6 (10%)	57	8	8 (14%)	23	5	5 (22%)	36	7	7 (20%)	65	0	0	64	0	0 (0%)

Number in parenthesis indicates the percentage of true biogenic amine former as compared to the number of selected isolates.

ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักทั้ง 3 ชนิดแสดงดังตารางที่ 3.15 เชื้อที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาร้าเป็นแบคทีเรียรูปร่างเซลล์เป็นท่อน แกรมลบ จากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API พบว่ามีความเหมือนใกล้เคียงกับ *Klebsiella ornithinolytica* และ *M. morganii* มากที่สุด สำหรับในผลิตภัณฑ์แหนมปลาและปลาส้ม พบทั้งแบคทีเรียที่เป็นรูปร่างเซลล์เป็นท่อนแกรมลบ และรูปร่างเซลล์กลม แกรมบวก ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียรูปรูปร่างเซลล์เป็นท่อนแกรมลบ พบว่ามีหลายชนิด (ตารางที่ 3.15) แต่มีเพียง *M. morganii* และ *E. aerogenes* ที่สามารถระบุสายพันธุ์ได้แน่ชัด ส่วนไอโซเลทอื่นมีลักษณะและรูปแบบการใช้น้ำตาลและคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ แตกต่างจากสายพันธุ์ในฐานข้อมูล API (bioMérieux) Rodtong (2005) รายงานว่า *M. morganii* และ *E. aerogenes* ที่คัดแยกจากปลากะตักสามารถเจริญและผลิตฮีสตามีนได้สูงสุดในอาหารเหลว Moller ที่ pH 5 ผลิตภัณฑ์แหนมปลาและปลาส้มมีค่า pH โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 5.2 และ 4.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9) ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะแก่การเจริญและสร้างฮีสตามีนของเชื้อทั้ง 2 ชนิด เชื้อเหล่านี้มีแนวโน้มที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต หรือเกิดจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพความสดต่ำ มากกว่าที่จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นการควบคุมคุณภาพความสดของวัตถุดิบร่วมกับสุขอนามัยในกระบวนการผลิต จะเป็นมาตรการสำคัญต่อการควบคุมปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์แหนมปลา และปลาส้ม

แบคทีเรียรูปร่างเซลล์กลม แกรมบวก ที่คัดแยกจากแหนมปลาและปลาส้ม สามารถระบุได้ว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* ซึ่งมี 1 ไอโซเลทที่มีความเหมือนกับ *Staphylococcus xylosus* ในระดับ 99.8% ซึ่งคัดแยกได้จากปลาส้ม (ตารางที่ 3.15) จิรวัฒน์ (2546) คัดแยก *S. xylosus* จากปลากะตักที่เน่าเสียและพบว่ามีความสามารถในการสร้างฮีสตามีนได้สูง อย่างไรก็ตาม Martuscelli et al. (2000) รายงานว่า *S. xylosus* ที่คัดแยกได้จากไส้กรอกหมักอิตาเลียน สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะสเปอร์มีนและสเปอร์มิดีน นอกจากนี้ยังมีบางสายพันธุ์ที่คัดแยกได้นี้มีความสามารถในการสลายฮีสตามีนด้วยเอนไซม์เอมีนออกซิเดส (Amine oxidase) นอกจากนี้ Mah et al. (2009) พบว่า *S. xylosus* สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตปลาหมักเกาหลี (Myeolchi-jeot) โดยกล้าเชื้อนี้มีคุณสมบัติในการลดฮีสตามีนและไทรามีนในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

ตาราง 3.15 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และผลการระบุชนิด /สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 18 ไอโซเลท จากตัวอย่างปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/ size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Pla-ra	PI	PRT7	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.9-1.5	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Klebsiella ornithinolytica*	83.0
	VRBG	PRT9	-	Rods/ 0.3-0.5 x 1.0-2.0	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	NR
Nham-pla	PI	2NBK8	-	Rods/ 0.1-0.3 x 0.5-0.6	-	+	S+/S+	+	-	3	-	-	*Pseudomonas aeruginosa*	NR
		NPK8	-	Rods/ 0.1-0.2 x 1.1-1.2	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Chryseomonas luteola*	NR
		NPC7	-	Rods/ 0.1-0.3 x 1.1-1.3	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Providencia stuartii*	NR
		NPM7	-	Rods/ 0.2-0.3 x 2.0-2.3	-	+	+/+	-	-	5.5	-	-	*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*	NR

ตารางที่ 3.15 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/ size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Nham-pla	PI	NPM10	-	Rods/ 0.1-0.2 x 1.0-1.2	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	99.9
	VRBG	NTK12	-	Rods 0.2-0.3 x 1.0-1.1	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Morganella morganii*	53.1
		NPA8	-	Rods/ 0.1-0.2 x 2.0-2.2	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Citrobacter braakii*	NR
		NPK14	-	Rods/ 0.1-0.2 x 1.1-1.2	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Providencia rettgeri*	99.9
	TSA (+10%NaCl)	1NBK-T10-3	+	Cocci/ 0.7-1.0	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus aureus*	55.2
Pla-som	PCA	NPR1	+	Cocci/ 0.8-1.0	-	+	-/-	+	-	-	-	-	*Staphylococcus homonis*	59.0

ตารางที่ 3.15 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/ size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Pla-som	PCA	SJJ4	-	Rods/ 0.5-0.7 x 1.1-1.3	+	+	+/+	+	-	-	-	-	*Vibrio fluvialis*	NR
	PI	2SNK10	-	Rods/ 0.2-0.4 x 0.8-1.0	-	+	+/+	+	-	-	-	-	*Pantoea spp 1*	NR
		SJJ17	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.9-1.5	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Aeromonas salmonicidia ssp*	NR
	VRBG	SJJ13	-	Rods/ 0.4-0.5 x 1.0-1.5	-	+	+/+	+	-	-	-	-	*Enterobacter aerogenes*	99.9
	TSA (+10%NaCl)	STR-T10-5	+	Cocci/ 0.5-0.7	-	+	-/-	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.8
		NPB-T10-2	+	Cocci/ 0.5-0.8	-	+	-/-	-	-	-	-	-	*Staphylococcus cohnii ssp cohnii*	54.4

[a]API system (API 20NE identification system for non-enteric Gram-negative rods, API 20E identification system for Enterobacteriaceae and other Gram-negative rods, and API Staph system for identification of genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*)

S+ = Slightly positive

NR = Not reported.

ผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็ม

ไอโซเลทที่คัดแยกจากปลาอินทรีย์เค็มทั้งหมด 97 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่ (47 ไอโซเลท) ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+10% NaCl (ตารางที่ 3.16) ซึ่งน่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่มชอบเกลือ/ทนเกลือในระดับปานกลาง (Moderately halophilic/halotolerant bacteria) อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการสร้างฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนแล้ว ปรากฏว่าไม่พบไอโซเลทใดที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven แต่เมื่อสุ่มไอโซเลทที่ได้ผลลบมาทดสอบในอาหาร Moller พบเพียง 3 ไอโซเลทที่สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ แสดงว่าอาหาร Niven ให้ผลลบที่ผิดพลาด (False-negative) ไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนคัดแยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ PI ส่วนตัวอย่างปลาทูเค็มสามารถคัดแยกไอโซเลทได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลท และสามารถคัดแยกไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนจากการคัดแยกด้วยอาหาร PCA คิดเป็น 40.6% นอกจากนี้พบเพียง 3 ไอโซเลท (คิดเป็น 20%) ที่สร้างไบโอจีนิกและอาจจัดเป็นแบคทีเรียที่ชอบเค็มและทนเค็มในระดับปานกลางซึ่งคัดแยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+10% NaCl

พบแบคทีเรียรูปร่างเซลล์เป็นท่อนซึ่งคัดแยกจากปลาอินทรีย์เค็มโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PI โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีความเหมือนกับ *Pseudomonas aeruginosa* 99.9% จำนวน 2 ไอโซเลท และ 1 ไอโซเลทมีความเหมือนกับ *Photobacterium damsela* 99.5% (ตารางที่ 3.17) ส่วนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์กลมที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มีความเหมือนกับ *S. xylosus* 99.6-99.8% จำนวน 3 ไอโซเลท และมีความเหมือนกับ *S. sciuri* 77% จำนวน 1 ไอโซเลท และอีก 1 ไอโซเลท มีความเหมือนกับ *S. cohnii* sub *cohnii* 90.5% และมี 2 ไอโซเลทที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้ Rodriguez-Jerez et al. (1994) คัดแยก *S. xylosus* จากปลากะตักหมักแบบสเปน (Spanish salted semi-preserved anchovies) โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างฮีสตามีนได้ 11.0 มก./100 ก. แบคทีเรียรูปร่างกลมในกลุ่มชอบเค็มปานกลางและทนเค็ม เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย การระบุชนิดโดยชุดทดสอบทางปฏิกิริยาทางเคมีแต่เพียงอย่างเดียวอาจมีข้อจำกัด เนื่องจากฐานข้อมูลในชุดทดสอบยังไม่ครอบคลุมถึงแบคทีเรียกลุ่มนี้ การระบุชนิดโดยใช้ข้อมูลของสารพันธุกรรมน่าจะเป็นแนวทางที่ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและสายพันธุ์ได้ครบถ้วนสมบูรณ์มากขึ้น

ตารางที่ 3.16 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Sample	Medium used for bacterial isolation											
	PCA medium			TSA medium (+10 %NaCl)			PI medium			TCBS medium		
	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former	Number of isolate selected	Positive isolate on Niven	True biogenic amine former
Salted Spanish mackerel	25	9	9 (36%)	47	0	3	17	4	4 (23.5%)	8	0	0
Salted mackerel	32	18	13 (40.6%)	10	3	3 (33.3%)	5	1	1 (20%)	0	0	0

Number in parenthesis indicate the percentage of true biogenic amine former as compared to the number of selected isolates.

ตารางที่ 3.17 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา และผลการระบุชนิด /สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 19ไอโซเลท จากตัวอย่างปลาเค็ม

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Salted Spanish mackerel	PI	26	-	Rods/ 0.2-0.5 x 0.7-1.1	-	+	S+/S+	-	+	-	-	-	*Pseudomonas aeruginosa*	99.9
		66	-	Rods/ 0.2-0.4 x 0.7-1.0	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Pseudomonas aeruginosa*	99.9
		17	-	Rods/ 0.4-0.6 x 0.5-0.7	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Photobacterium damsela*	99.5
		19	-	Cocci/ 0.5-0.7	-	+	S+/S+	-	+	-	-	-	Non identified	NR
	PCA	38	+	Cocci/ 0.6-0.7	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus sciuri*	77.0
		87	+	Cocci/ 0.6-0.8	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.6

ตารางที่ 3.17 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Salted Spanish mackerel	PCA	88	+	Cocci/ 0.4-0.9	-	+	+/+	-	-	-	-	-	Non identified	NR
		2	+	Cocci/ 0.5-0.6	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.8
	TCBS	11	+	Cocci/ 0.5-0.7	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus cohnii* spp *cohnii*	90.5
	TSA + 10%NaCl	24	-	Cocci/ 0.4-0.7	-	+	+/+	-	-	-	-	-	Non identified	NR
		26	+	Cocci/ 0.6-0.7	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.9
Salted mackerel	PI	8	-	Rods/ 0.5-0.6 x 0.8-1.0	-	+	+/+	-	-	-	-	-	Non identified	NR

ตารางที่ 3.17 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Salted mackerel	PI	9	-	Rods/ 0.3-0.5 x 0.6-1.0	-	+	+/+	-	-	7.5	-	-	Non identified	NR
	PCA	5	+	Cocci/ 0.5-1.0	-	+	S+/S+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.9
		9	+	Cocci/ 0.5-1.0	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.9
		15	+	Cocci/ 0.4-0.9	-	+	+/+	-	-	-	-	-	*Staphylococcus xylosus*	99.9
	TSA + 10%NaCl	22	+	Cocci/ 0.4-0.8	-	+	+/+	-	-	-	-	-	Non identified	NR
		24	+	Cocci/ 0.5-0.7	-	+	+/+	-	-	-	-	-	Non identified	NR

ตารางที่ 3.17 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial isolate code	Gram stain	Bacterial cell shape/size (μm)	Oxidase	Catalase	O/F test	Motility	Starch hydrolysis	Casein hydrolysis /Clear zone diameter (mm)	Tween80 hydrolysis /Precipitate zone diameter (mm)	Gelatin liquefaction	Identification result according to biochemical characteristics[a]	
													Closest relative	Identity (%)
Salted mackerel	TSA + 10%NaCl	3	+	Cocci/ 0.6-0.9	-	+	- / -	-	+	-	-	-	Non identified	NR

[a]API system (API 20NE identification system for non-enteric Gram-negative rods, API 20E identification system for *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative rods, and API Staph system for identification of genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*)

S+ = Slightly positive

NR = Not reported.

ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลาหมัก

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงในอาหารเหลว Moller (ตารางที่ 3.18) โดยไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญคือ ฮีสตามีน คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน *K. ornithinolytica* เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถสร้างคาดาเวอรีนได้สูง *M. morganii* ที่คัดแยกจากปลาร้าสามารถสร้างฮีสตามีน และพิวเทรสซีนได้สูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อ *M. morganii* ที่คัดแยกจากปลากะตัก (ตารางที่ 3.4) *K. ornithinolytica* เป็น สปีชีส์ที่แยกออกมาจาก *K. oxytoca* โดยลักษณะเด่นของแบคทีเรียชนิดนี้คือ ความสามารถในการแสดงกิจกรรมออร์นิธีน และ ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส ทำให้ได้ชื่อสปีชีส์ว่า "*ornithinolytica*" (Sakazaki et al., 1989) ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงสามารถสร้างพิวเทรสซีน และคาดาเวอรีนได้ ซึ่งจากผลการทดสอบในอาหารเหลว Moller ก็บ่งชี้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนได้สูง แม้จะได้ไอโซเลทที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนจากปลาร้าในจำนวนไม่มาก (6 ไอโซเลท) แต่ก็เป็นไอโซเลทที่สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงโดยเฉพาะพิวเทรสซีน ฮีสตามีน และคาดาเวอรีน การปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ปลาร้าจึงอาจทำให้ผลิตภัณฑ์นี้มีความเสี่ยงต่อการสะสมปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้

แบคทีเรียที่คัดแยกจากแหนมปลาทุกชนิดสร้างฮีสตามีนได้น้อยกว่า 20 มก./100 มล.ซึ่งจัดว่าสร้างอีสตามีนในระดับน้อย-ปานกลาง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 3.6) ซึ่งบ่งชี้ว่าฮีสตามีนไม่ใช่ไบโอจีนิกเอมีนหลักในผลิตภัณฑ์แหนมปลา อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแกรมลบที่พบว่า สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ ได้หลากหลายได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถสร้างพิวเทรสซีนและไทรามีนที่สูงมาก (ตารางที่ 3.18) ส่วน *Chryseomonas luteola* สร้างไทรามีนได้สูง นอกจากนี้ *M. morganii* บางสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ยังสามารถผลิตพิวเทรสซีนและไทรามีนได้สูง ส่วน *Citrobacter braakii* และ *Providencia rettgeri* สามารถสร้างไทรามีนได้สูง กล่าวโดยสรุปคือ แบคทีเรียแกรมลบในแหนมปลามีหลากหลายชนิดที่สร้างไทรามีน และพิวเทรสซีนได้สูงโดดเด่นกว่าฮีสตามีน ดังนั้นการพบปริมาณไทรามีนและพิวเทรสซีนสูงในผลิตภัณฑ์ บ่งชี้ว่าเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมลบเหล่านี้

ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาส้มในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนแสดงดังตารางที่ 3.18 จากการทดสอบแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดพบว่าไบโอจีนิกเอมีนเด่นที่สร้างคือพิวเทรสซีนซึ่งสร้างในปริมาณที่สูงมาก มีเพียง *E. aerogenes* ที่สร้างฮีสตามีน คาดาเวอรีนและไทรามีนได้สูง ส่วน *Pantoea* spp. เป็นแบคทีเรียที่สร้างไทรามีนได้สูง เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนตารางที่ 3.18 และปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 3.7) พบว่าไม่สัมพันธ์กัน กล่าวคือพิวเทรสซีน

และไทรามีนไม่ใช่ไบโอจีนิกเอมีนเด่นในผลิตภัณฑ์ปลาส้ม จึงมีความเป็นไปได้ว่าแม้เชื้อที่ปนเปื้อนจะมีศักยภาพในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงในอาหารเหลว แต่ในระบบปลาส้มซึ่งมีสภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิเก็บรักษาที่ต่ำ อาจไม่เอื้ออำนวยต่อการผลิตไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อเหล่านี้ จึงทำให้พิวเทรสซีน และไทรามีน ไม่ใช่ไบโอจีนิกเอมีนเด่นในผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียที่คัดแยกจากปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มโดยส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิตฮีสตามีนได้สูง โดยเฉพาะ *S. xylosus* บางสายพันธุ์ (ตารางที่ 3.19) เป็นที่น่าสังเกตว่า *P. aeruginosa* ที่คัดแยกจากปลาอินทรีย์เค็มไม่สร้างพิวเทรสซีน ในขณะที่แบคทีเรียชนิดเดียวกันที่คัดแยกจากแหนมปลาสามารถสร้างพิวเทรสซีนได้สูง (ตารางที่ 3.18) ซึ่งเป็นหลักฐานแสดงถึงความผันแปรของเชื้อตามถิ่นอาศัย เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์และความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อ พบว่าไบโอจีนิกเอมีนเด่นในผลิตภัณฑ์ปลาเค็มทั้งสองชนิดคือคาดาเวอรีน (ตารางที่ 3.8) ในขณะที่เชื้อที่คัดแยกได้สร้างคาดาเวอรีนได้น้อยมากหรือไม่สร้างเลย ผลดังกล่าวอาจเนื่องจากขั้นตอนแรกในการคัดแยกเชื้อมุ่งเน้นเชื้อที่สร้างฮีสตามีนโดยการให้อาหาร Niven ที่เติมฮีสตามีนเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถคัดกรองเชื้อที่สร้างคาดาเวอรีนได้ นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าคาดาเวอรีนที่สูงนี้น่าจะเกิดจากวัตถุดิบมากกว่ากระบวนการดองเค็ม ส่วนปริมาณฮีสตามีนที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์อาจเกิดจากวัตถุดิบเริ่มต้นซึ่งมีคุณภาพความสดต่ำ และ/หรือ มาจากกระบวนการดองเค็มโดยเป็นผลมาจากเชื้อในตารางที่ 3.19

ตารางที่ 3.18 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดต่างๆ

Sample	Isolation medium	Bacterial species	Biogenic amine content (mg/100 ml)						
			Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
Pla-ra	PI	*Klebsiella ornithinolytica*	3.58±1.31	21.6±0.5	97.12±0.25	25.9±0.1	ND	ND	ND
	VRBG	*Morganella morganii*	ND	179.64±4.64	ND	37.69±1.07	2.08±0.18	ND	ND
Nham-pla	PI	*Pseudomonas aeruginosa*	ND	222.51±17.16	2.12±0.25	6.67±1.02	269.96±22.30	ND	ND
	PI	*Chryseomonas luteola*	ND	ND	ND	9.74±0.49	136.87±7.74	ND	ND
	PI	*Providencia stuartii*	ND	ND	ND	15.05±1.02	5.00±1.67	ND	ND
	PI	*Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida*	ND	ND	ND	11.02±4.83	8.26±1.78	ND	4.53±1.41
	PI	*Morganella morganii*	ND	ND	ND	10.86±3.42	3.69±0.28	ND	4.63±1.25
	VRBG	*Morganella morganii*	ND	214.04±32.87	6.73±1.15	16.24±3.68	85.29±15.13	ND	ND
	VRBG	*Citrobacter braakii*	ND	25.17±6.08	ND	4.93±1.11	77.28±15.63	ND	ND
	VRBG	*Providencia rettgeri*	ND	ND	ND	6.70±0.23	158.50±29.10	ND	3.57±1.32
	TSA (+10%NaCl)	*Staphylococcus aureus*	ND	ND	ND	18.73±7.24	5.21±0.34	ND	ND

ND = Not detected.

ตารางที่ 3.18 (ต่อ)

Sample	Isolation medium	Bacterial species	Biogenic amine content (mg/100g)						
			Tryptamine	Putrescine	Cadavarine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
Pla-som	PCA	*Staphylococcus homonis*	2.02±0.29	ND	ND	11.70±1.90	3.52±0.36	ND	4.29±0.69
	PCA	*Vibrio fluvialis*	ND	237.53±10.12	59.76±2.63	1.38±0.83	49.05±1.67	ND	ND
	PI	*Pantoea* spp 1	ND	207.53±43.85	5.49±1.35	6.95±2.84	153.71±34.13	ND	ND
	PI	*Aeromonas salmonicidia* ssp	ND	221.85±10.34	20.01±1.00	2.09±0.07	89.76±5.09	ND	ND
	VRBG	*Enterobacter aerogenes*	ND	204.77±1.28	64.49±0.44	117.62±2.10	ND	ND	4.95±0.39
	TSA (+10%NaCl)	*Staphylococcus xylosus*	2.27±0.31	ND	ND	20.83±2.15	4.54±0.37	ND	8.53±0.47
		Staphylococcus cohnii ssp *cohnii*	2.20±0.23	ND	ND	9.75±0.77	4.08±0.13	ND	4.10±0.96

ND = Not detected.

ตารางที่ 3.19 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทู

Sample	Isolation medium	Number of isolate	Bacterial species	Biogenic amine content (mg/100g)						
				Tryptamine	Putrescine	Cadavarine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
Salted Spanich mackerel	PI	2	*Pseudomonas aeruginosa*	5.17±0.31	ND	1.05±0.05	21.36±0.25 - 28.43±2.20	5.45±0.33- 6.47±0.05	ND	ND
	PCA	2	*Staphylococcus xylosus*	4.42±0.23	1.36±0.92	0.59±0.03	10.57±0.12 - 43.85±4.14	6.35±0.17 - 8.62±0.20	ND	ND
	TSA (+10%NaCl)	1	*Staphylococcus xylosus*	ND	ND	ND	4.50±0.75	ND	ND	ND
	TCBS	1	*Staphylococcus cohnii ssp cohnii*	ND	ND	ND	3.00±0.12	ND	ND	ND
	PI	1	*Photobacterium damsela*	ND	ND	ND	5.82±0.80	ND	ND	ND
Salted mackerel	PCA	3	*Staphylococcus xylosus*	ND	2.70±0.19	ND	7.93±1.05 - 12.61±2.38	6.47±0.35 - 7.29±0.51	ND	ND
	PI	2	Not identified	ND	ND	ND	24.80±1.67 - 53.90±2.23	ND	ND	ND
	TSA (+10%NaCl)	3	Not identified	1.6±0.21 - 1.8±0.29	ND	ND	17.8±3.27- 24.7±1.98	2.90±0.03 - 3.30±0.84	ND	ND

ND = Not detected.

ผลของการเติมแต่งอาหารต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากผลการทดลองข้างต้น ได้คัดเลือกแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทที่สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงและสามารถระบุสายพันธุ์ได้ชัดเจน คือ *Enterobacter aerogenes* SJJ13 จากปลาส้ม และ *M. morganii* PCA13 จากปลากะตัก มาศึกษาผลของสารเติมแต่งอาหาร (Food additive) ต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีน แบคทีเรียบางชนิดแม้จะสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงในบางผลิตภัณฑ์ เช่น แหนมปลา หรือปลาส้ม (ตารางที่ 3.18) แต่มิได้นำมาศึกษา เนื่องจากผลระบุสายพันธุ์โดยชุดทดสอบ API ไม่ชัดเจน ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของ *E. aerogenes* SJJ13 จากปลาส้ม และ *M. morganii* PCA13 จากปลากะตัก แสดงดังตารางที่ 3.20

ตารางที่ 3.20 ผลของสารเติมแต่งอาหารชนิดต่างๆต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย 2 ชนิด

Microorganism	Food additive	Total viable counts (LogCFU/ml)
Enterobacter aerogenes SJJ13	Control	8.62±0.00[a]
	5% Glycine	7.41±0.07[b]
	0.5%EDTA	8.53±0.09[a]
	10%NaCl	6.87±0.01[d]
	1%Lactic acid	ND
	1%Citric acid	ND
Morganella morganii PCA13	Control	8.83±0.00[a]
	5% Glycine	7.36±0.08[c]
	0.5%EDTA	6.79±0.07[d]
	10%NaCl	8.62±0.00[b]
	1%Lactic acid	ND
	1%Citric acid	ND

ND = Not detected

Different letters denote significant difference ($p<0.05$) within the same microorganism.

ไกลซีนสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. aerogenes* SJJ13 และ *M. morganii* PCA13 ได้ประมาณ 1 LogCFU/ml (ตาราง 3.20) โดยจำนวนเชื้อคงเหลือในตัวอย่างอาหารที่เติมไกลซีนมีค่าประมาณ 7.3 LogCFU/ml ในขณะตัวอย่างควบคุมมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 8.8 LogCFU/ml ไกลซีนเป็นกรดอะมิโนซึ่งใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร โดยมีคุณสมบัติเด่นคือมีรสหวาน มีการใช้ไกลซีนร่วมกับโมโนโซเดียมกลูทาเมต เพื่อเพิ่มรสชาติในอาหาร นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหารของไกลซีน (Bontenbal and Vegt, 2006) โดยไกลซีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli, Salmonella,* และ *Campylobacter* ในเนื้อดิบ โดยที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% สามารถยับยั้ง *E. coli* และที่ระดับความเข้มข้น 0.2-3% สามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* นอกจากนี้ Ibrahim et al. (1996) รายงานประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 0.8 และ 1.6% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับไลโซไซม์ที่ผ่านการให้ความร้อน เพื่อให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน (Particially-deratured lysozyme) เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการลดปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของไกลซีนพบว่าไกลซีนสามารถลดการสร้างฮีสตามีนของ *E. aerogenes* SJJ13 จาก 151.86 ลงเหลือ 22.2 มก./100 มล. (ตารางที่ 3.21) หรือคิดเป็นการลดลงของฮีสตามีนถึง 85% นอกจากนี้ยังสามารถลดพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนลงได้ 48 และ 34% ตามลำดับ โดยไกลซีนไม่มีผลต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ ของ *E. aerogenes* ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแม้ไกลซีนจะไม่สามารถลดจำนวนของ *E. aerogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่ก็สามารถลดการสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของ *E. aerogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามไกลซีนมีผลต่อการลดปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของ *M. morganii* น้อยมาก โดยสามารถลดการสร้างฮีสตามีนของ *M. morganii* PCA13 ได้เพียง 34% และลดการสร้างพิวเทรสซีนได้เพียง 13% เท่านั้น ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าประสิทธิภาพของไกลซีนในการลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีนนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเป็นสำคัญ ในการศึกษานี้ไกลซีนสามารถยับยั้งการสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของ *E. aerogenes* SJJ13 ได้มีประสิทธิภาพมากกว่า *M. morganii* PCA13 จากการศึกษาของ Mah and Hwang (2009) พบว่าไกลซีนที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Myeolchi-jeot) เมื่อทดสอบในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อโดยสามารถลดการสร้างพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน ฮีสตามีน ไทรามีนและสเปอร์มิดีนได้ 32.6, 78.4, 93.2, 100.0 และ 100.0% ตามลำดับ ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าไกลซีนสามารถลดปริมาณไบโอจีนิกเอมีนได้อย่างไร แต่สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยไกลซีน และ/หรือไกลซีนมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าไกลซีนไม่มีผลยับยั้งการเจริญของทั้งเชื้อ *E. aerogenes* และ *M. morganii*

ดังนั้นปริมาณไบโอจีนิกเอมีนที่ลดลงของ *E. aerogenes* อาจมีผลมาจากการที่ไกลซีนรบกวนการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส อาจมีข้อโต้แย้งว่าไกลซีนอาจทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของดีคาร์บอกซิเลสทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เมทธิลเอมีน (Methylamine) แต่จากการวิเคราะห์ไม่พบเมทธิลเอมีนในตัวอย่าง แสดงว่าการลดลงของไบโอจีนิกเอมีนไม่ได้เกิดขึ้นจากการเป็นสารตั้งต้นแทนที่ (Alternative substrate) ของไกลซีน

EDTA ไม่มีผลต่อการเจริญของ *E. aerogenes* SJJ13 แต่สามารถลดการเจริญของ *M. morganii* PCA13 ลงได้ประมาณ 2 Log (ตารางที่ 3.20) และเมื่อพิจารณาผลของ EDTA ต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่า EDTA สามารถลดการสร้างฮีสตามีนของ *E. aerogenes* SJJ13 ได้ 49% และลดการสร้างพิวเทรสซีนลงได้ 47% (ตารางที่ 3.21) นอกจากนี้ยังสามารถลดการสร้างไทรามีนและสเปอร์มิดีนลงได้ 75 และ 57% ตามลำดับ (ตารางที่ 3.21) เป็นที่น่าสังเกตว่า EDTA มีผลเพิ่มปริมาณทริปทามีน คาดาเวอรีน ของ *E. aerogenes* มีรายงานว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 10-15% มีผลยับยั้ง *S. aureus* และ Streptococci (Rai et al., 2005) นอกจากนี้ Lambert et al. (2004) รายงานว่า EDTA ที่ความเข้มข้นต่ำ (< 1,000 ppm) มีผลยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* เนื่องจาก EDTA ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวสามารถเข้าจับกับไอออน (Chelate) ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนที่ความเข้มข้นสูง(>1,000 ppm) EDTA มีผลทำลายโครงสร้าง lipopolysaccharide ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) นอกจากนี้ Ko et al. (2010) รายงานว่า EDTA มีผลระงับการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่ระดับความเข้มข้น 1-2 มก./มล. ยังไม่เคยมีรายงานผลของ EDTA ต่อการลดไบโอจีนิกเอมีนมาก่อน ผลจากงานวิจัยนี้บ่งชี้ว่า EDTA สามารถลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีนใน *E. aerogenes* และ *M. morganii* สำหรับกลไกในการยับยั้งการสร้างฮีสตามีนยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ไม่น่าเกี่ยวข้องกับการลดปริมาณเชื้อของ EDTA เนื่องจากในการทดลองนี้ EDTA มีผลลดจำนวนเชื้อเพียงเล็กน้อย ความสามารถในการลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อทั้งสองชนิดนี้อาจเกิดจาก EDTA มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส Guirard and Snell (1987) รายงานว่าเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสจาก *E. aerogenes* เป็นเอนไซม์ที่มี 2 หน่วยย่อย (Subunit) และมี pyridoxal 5'-phosphate เป็นโคเอนไซม์ (Coenzyme) และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่พี-เอช 6.5

โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 10% ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *E. aerogenes* SJJ13 และ *M. morganii* PCA13 (ตารางที่ 3.20) แต่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนทุกชนิดของ *E. aerogenes* SJJ13 (ตารางที่ 3.21) และมีผลยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนหลักที่สร้างโดย *M. morganii* PCA13 แต่ไม่มีผลต่อการสร้างไทรามีนและสเปอร์มิดีน (ตารางที่ 3.21) Rodtong et al. (2005) รายงานว่าที่ระดับเกลือเข้มข้น 10% สามารถยับยั้งการสร้างฮีสตามีนของ *E. aerogenes*, *M. morganii* และ

Proteus vulgaris ที่คัดแยกจากปลากะตัก ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการใช้เกลือที่ความเข้มข้น 10% สามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของ *M. morganii* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นแนวทางในการลดปัญหาการสะสมไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักได้ อย่างไรก็ตามการใช้เกลือที่ความเข้มข้น 10% ในผลิตภัณฑ์ปลาส้มอาจไม่สามารถทำได้ในทางปฏิบัติ Mah and Hwang (2009) รายงานว่าที่ความเข้มข้นเกลือสูงถึง 25% ยังไม่สามารถลดการสร้างฮีสตามีน คาดาเวอรีนและพิวเทรสซีนของ *Bacillus licheniformis* ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของเกาหลีได้

กรดแล็กติกและซิตริกที่ระดับความเข้มข้น 1% มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด เนื่องจาก ตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่างที่เติมกรดทั้งสอง (ตารางที่ 3.20) นอกจากนี้กรดทั้งสองยังมีผลยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญคือ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 3.21) กรดทั้งสองชนิดยังมีผลลดการสร้างไทรามีนและสเปอร์มิดีนของ *E. aerogenes* ได้ถึง 77 และ 44% ตามลำดับ แต่กรดแล็กติกไม่มีผลต่อการลดไบโอจีนิกเอมีนทั้งสองที่สร้างโดย *M. morganii* ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่ากรดทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพทั้งในการลดปริมาณเชื้อที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนและลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีน นอกจากนี้ยังบ่งชี้ว่าการเกิดไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า ปลาส้มและแหนมปลาอาจมีโอกาสเกิดได้น้อย เนื่องจากปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอยู่ในช่วง 1.7-2% (ตารางที่ 3.9) ซึ่งสูงพอที่จะยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ ดังนั้นจึงอาจอนุมานได้ว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนสูงนั้นเกิดขึ้นจากคุณภาพความสดของวัตถุดิบเป็นสำคัญ การควบคุมปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักเหล่านี้จึงควรควบคุมคุณภาพความสดของวัตถุดิบ กรดแล็กติกและซิตริกที่ระดับความเข้นข้น 5-10% สามารถลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของ *B. licheniformis* ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักเกาหลีได้ประมาณ 20-50% (Mah and Hwang, 2009) และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ 2 ชนิดที่ศึกษานี้จะเห็นได้ว่าเชื้อ *E. aerogenes* และ *M. morganii* มีความไว (Sensitivity) ต่อกรดแล็กติกและซิตริกมากกว่า *B. licheniformis* ดังจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของกรด 1% ก็สามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อทั้งสองได้มากกว่า 90% อย่างไรก็ตามเมื่อเติมสารละลายกรด อะซิติก ซิตริก และแล็กติก เข้มข้น 0.2 โมลาร์ในระดับ 10% ของน้ำหนักเนื้อหมูและวัวบด พบว่าไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ *B. cereus, E. cloacae,* และ *Alcaligenes faecalis* และไม่สามารถลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อเหล่านี้ได้ (Min et al., 2007) ดังนั้นความสามารถของกรดแล็กติกและซิตริกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อและการสร้างไบโอจีนิกเอมีนจึงขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อเป็นสำคัญ

ตารางที่ 3.21 ผลของสารเติมแต่งต่อการสร้างไบโอเจนิกเอมีน (มก./100 มล.) ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลาทะตักและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

Microorganism	Additive	Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine
Enterobacter aerogenes SJJ13	Control	5.30±0.71^{b}	162.20±4.04^{a}	23.64±0.57^{b}	151.86±1.95^{a}	2.20±0.14^{a}	4.15±0.52^{a}	ND
	Glycine	4.91±0.03^{b}	83.75±18.56^{b}	15.53±0.33^{c}	22.20±1.10^{c}	1.78±0.50^{a}	2.59±0.05^{b}	ND
	EDTA	8.67±1.02^{a}	86.40±0.96^{b}	35.00±0.01^{a}	77.75±1.60^{b}	0.55±0.00^{b}	1.80±0.11^{b}	1.57±0.07^{c}
	NaCl	ND	0.68±0.03^{c}	0.11±0.02^{d}	2.27±0.24^{d}	0.50±0.01^{b}	0.28±0.02^{b}	0.26±0.02^{a}
	Lactic	ND	0.63±0.11^{c}	0.69±0.01^{d}	2.14±0.64^{d}	0.59±0.45^{b}	2.36±0.12^{b}	ND
	Citric	ND	0.74±0.02^{c}	1.36±0.12^{d}	3.32±0.60^{d}	0.48±0.01^{b}	2.33±0.16^{b}	2.37±0.15^{b}
Morganella morganii PCA13	Control	ND	175.5±1.95^{a}	6.85±0.47^{a}	86.45±0.48^{a}	2.02±0.03^{ab}	5.50±0.37^{a}	ND
	Glycine	ND	152.8±8.03^{b}	2.64±0.00^{b}	56.92±7.59^{b}	2.37±0.98^{a}	5.11±0.04^{a}	ND
	EDTA	ND	27.0±4.72^{c}	1.31±0.04^{c}	31.6±2.95^{c}	1.00±0.02^{bc}	3.68±0.28^{b}	ND
	NaCl	ND	0.92±0.37^{d}	0.98±0.45^{c}	2.55±0.81^{d}	2.26±0.46^{a}	3.37±0.35^{b}	ND
	Lactic	ND	0.92±0.39^{d}	1.02±0.53^{c}	2.99±0.83^{d}	2.19±0.23^{a}	3.30±0.49^{b}	ND
	Citric	ND	0.93±0.25^{d}	0.70±0.09^{c}	1.91±0.41^{d}	0.45±0.04^{c}	2.00±0.49^{c}	2.66±0.31^{a}

ND = Not detected.

Different letters denote significant difference ($p<0.05$) within the same column of each microorganism.

บทที่ 4
บทสรุป

การเน่าเสียของปลากะตักซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตน้ำปลานั้นไม่เพียงแต่ก่อให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนเท่านั้น แต่ปริมาณพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และไทรามีน เพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาเน่าเสียที่ 25°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนการเน่าเสียในน้ำแข็งทำให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนเท่านั้น การเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิต่ำ เช่นเก็บในน้ำแข็ง ในระหว่างการขนส่งจึงเป็นมาตรการสำคัญที่สามารถลดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักได้ และจากการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนจากปลากะตักที่เน่าเสียพบว่า *Morganella morganii* เป็นแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญ โดยสร้างทั้งฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีน นอกจากนี้ *Pseudomonas fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเน่าเสียของปลากะตักที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างพิวเทรสซีนที่สูงมาก (184.37±10.73 มก./มล.) งานวิจัยนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เป็นอาหารที่สามารถใช้คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงได้จำนวนมาก เมื่อเทียบกับอาหารที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียเฉพาะกลุ่ม (Selective media) เช่น PI และ TCBS

ผลิตภัณฑ์ปลาร้า แหนมปลา และปลาส้มมีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนสูงเกินค่ามาตรฐานสากล (ฮีสตามีน > 5-10 มก./100 ก.) ไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ปลาร้า คือ ฮีสตามีน คาดาเวอรีน และไทรามีน ในผลิตภัณฑ์แหนมปลาคือ พิวเทรสซีนและฮีสตามีน ส่วนผลิตภัณฑ์ปลาส้มมีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนต่ำกว่า 2 ผลิตภัณฑ์แรก มีเพียง 10% ของตัวอย่างที่สุ่มมาศึกษาเท่านั้นที่มีทั้งฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาดาเวอรีนในระดับที่สูง ปลาอินทรีย์เค็มเป็นอีกหนึ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่มีการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีน คาดาเวอรีน และพิวเทรสซีน ในระดับสูงกว่า 20 มก./100 ก. ส่วนปลาทูเค็มเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการสะสมของฮีสตามีนสูง

แบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนที่คัดแยกได้และสามารถระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้คือ *Klebsiella ornithinolytica* ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาร้าและสร้างคาดาเวอรีน (97.12±0.25 มก./มล.) เป็นหลัก ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหนมปลาคือ *Providencia rettgeri* สร้างไทรามีนได้สูงถึง 158.50±29.10 มก./มล. และ *M. morganii* สร้างพิวเทรสซีนและไทรามีนได้สูง (214.04±32.87 และ 85.29±15.13 มก./มล.) ในผลิตภัณฑ์ปลาส้มพบ *Enterobacter aerogenes* ที่สร้างพิวเทรสซีน ฮีสตามีน และคาดาเวอรีนในปริมาณสูง คือ 204.77±1.28, 117.62±2.10 และ 64.49±0.44 มก./มล. ตามลำดับ และ *Staphylococcus xylosus* ซึ่งสร้างฮีสตามีนได้ปานกลาง (~20 มก./มล.) ส่วนแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาอินทรีย์เค็มและปลาทูเค็มคือ *Staphylococcus xylosus* นอกจากนี้ยังพบ *Pseudomonas*

aeruginosa และ *Photobacterium damsela* ในตัวอย่างปลาอินทรีย์เค็ม โดยแบคทีเรียเหล่านี้สร้างฮีสตามีนเป็นหลัก

การเจริญของแบคทีเรีย *M. morganii* PCA13 ที่คัดแยกจากปลากะตักและ *E. aerogenes* SJJ13 ที่คัดแยกจากปลาส้มลดลงเพียง 1 LogCFU/ml เมื่อเติมกรดอะมิโนไกลซีนในปริมาณ 5% ลงในอาหารเหลว Moller แต่ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของ *E. aerogenes* ลดลง 85 และ 48% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้เติมไกลซีน ในขณะที่การสร้างฮีสตามีนของ *M. morganii* ลดลงเพียง 34% เมื่อเติมไกลซีน สาร EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองเพียง 2 LogCFU/ml แต่สามารถลดปริมาณการสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของ *M. morganii* ลงได้ 67 และ 85% ตามลำดับ และลดการสร้างไบโอจีนิกเอมีนทั้งสองของ *E. aerogenes* ลง 46% เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 10% ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ แต่สามารถยับยั้งการสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนของเชื้อทั้งสองได้มากกว่า 90% ในขณะที่กรดแล็กติกและซิตริกที่ระดับความเข้มข้น 1% มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองโดยสมบูรณ์และสามารถยับยั้งการสร้างฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และไทรามีน ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ปลาหมักได้เป็นอย่างดี การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า แหนมปลา และปลาส้ม มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยเนื่องจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีกรดในระดับ 1%

ข้อเสนอแนะ

1. การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักและปลาดองเค็มที่ยังได้ผลไม่ชัดเจนเมื่อใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีนั้น ควรมีการศึกษาต่อทั้งสมบัติทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ในเชิงลึกและข้อมูลของสารพันธุกรรม เพื่อให้ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แน่ชัด เพื่อนำไปสู่แนวทางการกำจัดแบคทีเรียดังกล่าว หรือลดสารไม่พึงประสงค์ที่เป็นผลผลิตของแบคทีเรียเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. ควรศึกษาระดับที่เหมาะสมของ ไกลซีน EDTA กรดแล็กติก กรดซิตริก และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญ หรือการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียหลักที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมักดอง

3. ควรศึกษากลไกในการยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของไกลซีนและ EDTA

เอกสารอ้างอิง

จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล สุรีลักษณ์ รอดทอง และ ปิยะวรรณ กาสลัก. 2546. ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 98 หน้า

อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ และคนกพร อธิสุข. 2533. การเตรียมตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพิษที่คนไทยได้รับจากการบริโภคอาหารประจำวัน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 4: 169-184.

Ababouch, L., Afilal, M.E., Rhafiri, S. and Busta, F. F. 1991. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sadine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25° C). Food Microbiol. 8: 127-136.

Ababouch, L., Afilal, M.E., Benabdeljelil, H. and Busta., F.F. 1991. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. Int. J. Food Sci. and Tech. 26: 297-306.

Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J.M.V., Villa, T.G., and Barros-Velazquez, J. 2000. Characterization of biogenic amine producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. Int. J. Food Microbiol. 57: 19-31.

Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., and Hammes, W.P. 1990. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxlase assay medium. Let. In Applied Microbiol. 11: 278-281.

Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry suasages. J. AOAC Int. 76(3): 575-577.

Fatih, Ö., Nihal, K., Esmeray, K. and Yesim, Ö.2009. The effects of ice storage on inosine monophosphate, inosine, hypoxanthine, and biogenic amine formation in European catfish (*Silurus glanis*) fillets. Int. J. Food Sci. 44: 1966-1972.

Gibson, D.M. 1995. Hygiene and safety of seafood. In *Fish and Fisheries Products Composition, Nutritive Properties and Stability*. A.Ruiter (Ed.) CAB International, Oxon, United Kingdom.

Guirard, B.M. and Snell, E.E. 1987. Purification and properties of pyridoxal-5'-phosphate-dependent histamine decarboxylases from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes*. J. Bact. 169(9): 3969-3968.

Hernández-Herrero, M.M., Roig-Sagués, A.X., Rodríguez-Jerez, J.J and Mora-Ventura, M.T. 1999. Halotolerant and haloplilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus*). J. Food Protect. 62: 509-514.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.

Hyung, M.J. and Joon, H.H. 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. J. Food Control. 20: 796-801.

Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Sugimoto, Y. and Aoki, T. 1996. Antimicrobial synergism of partially-denatured lysozyme with glycine: effect of sucrose and sodium chloride. Food Research Int. 29: 771-777.

Karovicova, J. and Kohajdova. 2005. Biogenic amine in food. Chem. Pap. 59: 70-79.

Kim, S.H., Field, K.G., Morrissey, M.T., Price, R.J., Wei, C.I. and An, H. 2001a. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. J. Food Protect. 64: 1035-1044.

Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I. and An, H. 2001b. Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. J. Food Sci. 67: 1515-1521.

Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I. and An, H. 2002. Histamine production by *Morganella moeganii* in mackerel, albacore, mahi-mani, and salmon at various storage temperatures. J. Food Sci. 67: 1522-1528.

Kimura, B., Konagaya, Y., Fujii, T. 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. Int. J. Food Microbiol. 70: 71-77.

Kirschbaum, J., Rebscher, K., Brückner, H. 2000. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. J. Chromatogr. A. 881: 517-530.

Lakshmanan, R., Shakila, R.J. and Jeyasekaran, G. 2002. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. J. Food Microbiol. 19: 617-625.

Lambert, R.J.W., Hanlon, G.W. and Denyer, S.P. 2004. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Microbiol. 96: 244-253.

Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 77: 401-407.

Mah, J.H., Han, H.K., Oh, Y.J., Kim, M.G., Hwang, H.J. 2002. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. J. Food Chem. 79: 239-243.

Mah, J. H. and Hwang, H. J. 2009. Effect of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). J. Food Chem. 114: 168-173.

Mah, J. H. and Hwang, H. J. 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. J. Food Control. 20: 796-801.

Maijala, R.L. and Eerola, S. 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. Meat Sci. 35: 387–395.

Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P., and Hirvi, T. 1995. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. J. Food Sci. 60(6): 1187-1190.

Malle, P., Valle, M., Bouquelet, S. 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Int. 79(1): 43-49.

Martuscelli, M., Crudele, M.A., Gardini, F. and Suzzi, G. 2000. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. Let. Appl. Microbiol. 31: 32-228.

Middlebrooks, B.S., Toom, P.M., Douglas, W.L., Harrison, R.E., McDowell, S. 1988. Effect of storage, time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel. J. Food Sci. 53: 1024-1029.

Min, J.S., Lee, S.O., Jang, A., Jo, C. And Lee, M. 2007. Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. J. Food Chem. 104: 791-799.

NIPC, 1993. Fish Products Inspection Manual. Canada. O¨- Zogul, F. and, O¨- Zogul., Y. 2005. Formation of biogenic amines by Gram-negative rods isolatedc from fresh, spoiled, VP-packed and MAP-packed herring (*Clupea harengus*). Eur. Food Res. Technol. 221: 575–581.

Rai, B., Jain, R., Kharb, S. and Anand, S. 2005. Comparative Anti-microbial Activity of two Chelating Agent: An Invitro Study. Internet J. Dental Sci. Volume 3 Number 1.

Ruiz-Capillas, C. and Moral, A. 2001. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius, L.*) stored in ice. J. Food Sci. 66: 1030-1032.

Rodtong, S., Nawong, S, Yongsawatdigul, J. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indain anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiol. 22: 475-482.

Rodríguez-Jerez, J.J., Giaccone, V., Colavita, G. and Parisi, E. 1994. *Bacillus macerans* a new protent histamine producing micro-organism isolated from Italian cheese. Food Microbiol. 11: 409-415.

Rossi, S., Lee, C., Ellis, P.C. and Pivarnik, L.F. 2002. Biogenic amines formation in bigeye tuna steaks and whole skipjack tuna. J. Food Sci. 67: 2056-2060.

Roig-sagués, A.X., Hernández-Herrero, M., Rodríguez-Jerez, J.J., López-Sabater, E.I., and Mora-Ventura, M.T. 1997. Histidine decarboxylase activity of *Enterobacter cloacaes* 15/19 during the production of ripened sausages and its influence on the formation of cadaverine. J. Food Protect. 60: 430-432.

Ryser, E.T., Marth, E.H. and Taylor, S.L. 1984. Hiatamine production by psychrotrophic pseudomonads isolated from tuna fish. J. Food Protect. 47: 378-380.

Saaid, M., Saad, B., Hasnim, N.H., Ali, A.S.M. and Saleh, M.I. 2009. Determination of biogenic amine in selected Malaysian food. J. Food Chem. 113: 1356-1362.

Sakazaki, R., Tamura, K., Kosako, Y. and Yoshizaki, E. 1989. *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*. J. Current Microbiol.18: 201-206.

Saisithi, P. 1994. Traditional fermented fish: fish sauce production. In Fisheries Processing: Biotechnological Application, A.M. Martin (ed), p. 111-131. Chapman&Hall, London.

Sato, T., Okuzumi, M., Masuda, T., and Fujii, T. 1995. Distribution and genus/species composition of histamine-decomposition bacteria during storage of commom mackerel. Fisheries Sci. 61: 83-85.

Santos, M.H.S. 1996. Biogenic amines: their impotance in foods. Food Microbiol. 29: 213-231.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Taylor, S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. J. Food Protect. 54: 460-470.

Subhasis, S., Jose, J. Kumar and Ashok, K. 2008. Changes in biogenic amines during iced and ambient temperature storage of tilapia. J. Sci. Food and Agric. 88: 2208-2212.

Tanasupawat, S. and Komagata, K. 1995. Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. J. Microbiol. Biotech. 11: 253-256.

Taylor, S.L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. Crit. Rev. Toxicol. 17: 91-128.

Thongsanit, J. 1999. DNA-DNA hybridization in the identification of *Tetragenococcus* species isolated from fish sauce fermentation. Master Thesis. Chulalongkorn University.

Veciana-Nogues, M.T., Albala-Hurtado, S., Marine-Font, A., and Vidal-Carou, M.C. 1996. Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. J. Food Protect. 59: 1218-1222.

Veciana-Nogues, M.T., Vidal-Carou, M.C., and Marine-Font, A. 1990. Histamine and tyramine during storage and spoilage of anchovie, *Engrulis encrasicholus*: relationships with other fish spoilage indicators. J. Food Sci. 55: 1192-1193, 1195.

Ward, D.R. 1994. Microbiological quality of fishery products In *Fisheries Processing Biotechnological Application.* A.M. Martin (Ed.) Chapman Hall, London, United Kingdom p. 1-17.

Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., and Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). J. Food Sci. 69(4): FCT312-319.

http://fic.nfi.or.th/th/home/default.asp

ภาคผนวก

ก. สารละลายและสีย้อม

1. Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เป็นส่วนประกอบให้เข้ากัน

2. Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	กรัม

ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม

Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

3. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ
เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

5. Safranin (Gram stain)

Safranin O (2.5% solution ใน 95% Ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

6. Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%)

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask เก็บไว้ในขวดสีชา

ข. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Motility test medium

Tryptose	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. MRS broth

MRS broth เป็นอาหารสำเร็จ จากบริษัท Merck (Merck KGaA, Germany) มีการดัดแปลงโดยเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. MRS agar

เตรียมได้จาก MRS broth ที่เติม Agar 15.0 กรัมต่อลิตร และมีการดัดแปลงโดยเติม 10% NaCl หลอมให้ Agar ละลายด้วยความร้อน ทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Moller Broth

L-Lysine	4.0	กรัม

L-Histidine	4.0	กรัม
L-Ornithine	4.0	กรัม
L-Tyrosine	4.0	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Niven

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Histidine	27.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
$CaCO_3$	1.0	กรัม
Agar	30.0	กรัม
Bromocresol purple	60.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Niven (สูตรดัดแปลง)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Histidine	27.0	กรัม

NaCl	5.0	กรัม
$CaCO_3$	1.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.04	กรัม
Agar	50.0	กรัม
Bromocresol purple	60	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Nutrient gelatin

Beef extract	2.4	กรัม
Peptone	4.0	กรัม
Gelatin	96.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Plate count agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agar หลอมละลาย ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 7.0±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หรืออาหารสำเร็จ merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

9. Plate count agar (PCA) ที่เติม skim milk

ใช้อาหารสำเร็จบริษัท merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เตรียม Reconstituted skim milk (10% solids) ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสม Reconstituted skim milk ปริมาณ 1% ลงใน PCA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

10. Pseudomonas isolation (PI)

ใช้อาหารสำเร็จบริษัท Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Starch agar

Soluble starch	2.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar

ใช้อาหารสำเร็จบริษัท Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. Trypticase (tryptic) soy broth (TSB)

Trypticase หรือ Tryptone (Pancreatic digest ของcasein)	17.0	กรัม
Phytone (Papaic digest ของ soya meal)	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.3±0.2

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.3±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีหรือใช้อาหารสำเร็จ merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

กรณี TSA เติม Agar 15 กรัม/ลิตร

14. Tween–80 Agar

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Calcium chloride	0.1	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Tween-80	10.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. Violet red bile agar with glucose (VRBG)

ใช้อาหารสำเร็จบริษัท merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) สำหรับอาหาร VRBG ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อแต่หลอมให้ Agar ละลายโดยการต้ม จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อที่ผ่านฆ่าเชื้อแล้ว

1. ชื่อ(ภาษาไทย) นาย จิรวัฒน์ นามสกุล ยงสวัสดิกุล

   (ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirawat Yongsawatdigul

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3101200691826

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-224-387

E-mail: jirawat@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
2532	ปริญญาตรี	วท.บ.(วิทยาศาสตร์บัณฑิต) เกียรตินิยมอันดับ 2	เทคโนโลยีอาหาร	เทคโนโลยีอาหาร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2535	ปริญญาโท	M.S. (Master of Science)	Food Science	Food processing	University of Wisconsin-Madison	สหรัฐอเมริกา
2539	ปริญญาเอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	Food Science and Technology	Seafood chemistry	Oregon State University	สหรัฐอเมริกา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-Food proteins, Food enzymes

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. Factors affecting histamine in fish sauce fermentation
2. Proteinases and transglutaminase activity in freshwater fish species
3. Reduction of biogenic amines content during fish sauce fermentation
4. Influence of freshness quality and actomyosin denaturation on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) muscle proteins
5. Purification and characterization of transglutaminase from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)
6. Covalent cross-linking of threadfin bream muscle proteins by transglutaminase(s)

7. Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi
8. Process development of fishball and fish sausage from freshwater fish species
9. Biogenic amine formation in anchovies and fermented fish products
10. Acceleration of fish sauce production using starter cultures and proteinases
11. Study in catalytic reaction of transglutaminase in threadfin bream surimi using MALDI-TOF
12. Conformation changes of muscle proteins from tropical fish species.

7.2 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., Yongsawatdigul, J. 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. International Journal of Food Microbiology 141: 186–194.

Tadpitchayangkoon, P., Park, J., Mayer, S., Yongsawatdigul, J. 2010. Structural Changes and Dynamic Rheological Properties of Sarcoplasmic Proteins Subjected to pH-Shift Method. J. Agric. Food Chem. 58:4241-4249.

Tadpitchayangkoon, P. Park, J.W., and Yongsawatdigul, J. 2010. Physicochemical and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. Food Chem. 121: 1046-1052.

Yongsawatdigul, J. and Hemung, B. 2010. Structural changes and functional properties of threadfin bream sarcoplasmic proteins subjected to pH-shifting treatments and lyophilization. J. Food Sci. 75(3): C251-257.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2010. Purification and Characterization of a Salt-Activated and Organic Solvent-Stable Heterotrimer Proteinase from Virgibacillus sp. SK33 Isolated from Thai Fish Sauce. J. Agric. Food Chem. 58: 248-256.

Piyadhammaviboon, P., Yongsawatdigul, J. 2010. Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). J. Sci Food Agric. 90(2): 291-298.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2010. A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. Food Chem. 119:573-579.

Tadpitchayangkoon, P. and Yongsawatdigul, J. 2009. Comparative study of washing treatments and alkali extraction on gelation characteristics of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) muscle protein. J. Food Sci. 74(3): C284-C291.

Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. 2009. Identification of glutaminyl sites on β-lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. Food Chem. 115: 149-154.

Piyadhammaviboon, P. and Yongsawatdigul, J. 2009. Protein cross-linking ability of sarcoplasmic proteins extracted from threadfin bream. LWT-Food Science and Technology. 42(1): 37-43.

Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. 2008. Reactivity of fish and microbial transglutaminases on glutaminyl sites of peptides derived from threadfin bream myosin. J. Agric. Food Chem. 56(16): 7510-7516.

Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. 2008 Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases. Food Chem. 111(2): 439-446.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2008. Characterization of Ca^{2+}-activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. LWT-Food Sci Tech. 41: 2166-2174.

Hemung, B and Yongsawatdigul, J. 2008 Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nemipterus* sp.) liver. J. Food Biochem. 32:182-200.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. Process Biochem. 43:185-192.

Park, J.D., Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., Park, J.W. 2008. Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs. J. Food Sci. 73:C191-197.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., Raksakulthai, N. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter culture. J. Food Sci. 72: M382-M390.

Panpipat, V, Yongsawatdigul, J. 2008. Stability of potassium iodide and omega-3 fatty acids in fortified freshwater fish emulsion sausage. LWT-Food Sci Tech. 41:483-492.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2007. NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation J. Food Sci. 72:C264-C269.

Yongsawatdigul, J. and Piyadhammaviboon, P. 2007. Gel enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. J. Sci Food Agric. 87:2810-2816.

Yongsawatdigul, J., Sinsuwan, S. 2007. Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. Food Hydrocolloids. 21: 359-367.

Sirighan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2007. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus)*. Food Chem. 101: 82-89.

Sirighan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2006. Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus indicus)* during fish sauce fermentation. J Sci Food Agric. 86(12): 1970-1976.

Yongsawatdigul, J., Piyadhammaviboon, P., Singchan, K. 2006. Gel-forming ability of small scale mud carp unwashed and washed mince as related to endogenous proteinases and transglutaminase activities. Eur. Food Res. Technol. 223(6): 769-774.

Sirighan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Chem. 98(4): 678-684.

Young, K., Yongsawatdigul, J., Park, J., Thawornchinsombat, S. 2005. Characterisitcs of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. 29: 517-532.

Hemung, B. and Yongsawatdigul, J. 2005. Ca^{2+} affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model. Food Sci. 70:C455-460.

Yongsawatdigul, J. and Piyadhammaviboon, P. 2005. Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. J. Sci Food Agric. 85(9): 1453-1460.

Worratao, A. and Yongsawatdigul, J. 2005. Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food Chem. 93:651-658.

Rodtong, S., Nawong, S, Yongsawatdigul, J. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indain anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiol. 22(5):475-482.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2004. Effect of alkaline and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish proteins. J. Food Sci. 69(7):C499-505.

Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). J. Food Sci. 69(4):FCT312-319.

Yongsawatdigul, J. and Piyadhammaviboon, P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. Food Chem. 87: 447-455.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. Food Chem. 83(3): 406-416.

Worratao, A and Yongsawatdigul, J. 2003. Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. J. Food Biochem. 27: 35-51.

Yongsawatdigul, J., Worratao, A., and Park, J. 2002. Effect of endogenous transglutaminase on gelation of threadfin bream surimi. J. Food Sci. 67(9): 3258-3263.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2002. Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice. J. Food Sci. 67(3): 985-990.