



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)

ปริญญา

ผลิตภัณฑ์ประมง

ผลิตภัณฑ์ประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งคัดแยกได้จากปลากลุ่มสคอมบรอยด์

Effect of Some Essential Oils and Indigenous Plant Extracts Against Histamine-forming Bacteria Isolated from Scombroid Fish

นามผู้วิจัย นางสาวนงพงา แสงเจริญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงษ์เทพ วิไลพันธ์, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นงนุช รักสกุลไทย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณ มาลาพันธ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิดในการยับยั้งการเจริญ
ของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งคัดแยกได้จากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์

Effect of Some Essential Oils and Indigenous Plant Extracts Against
Histamine-forming Bacteria Isolated from Scombroid Fish

โดย

นางสาวนงพงา แสงเจริญ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)

พ.ศ. 2552

นางพงา แสงเจริญ 2552: ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนซึ่งคัดแยกได้จากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง) สาขาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงษ์เทพ วิไลพันธ์, วท.ด. 169 หน้า

พิษจากสารอิซทาไมนที่เกิดกับมนุษย์ มักเกิดจากการบริโภคปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์ โดยอิซทาไมนถูกสร้างขึ้นจากแบคทีเรียบางชนิดที่พบปนเปื้อนในปลากลุ่มดังกล่าว จากผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนจากปลาหู ปลาโอลาย และปลาอินทรี สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนได้ทั้งสิ้น 166 ไอโซเลต ในจำนวนนี้พบว่า *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เป็นแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนได้ปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิดและสารสกัดด้วยเอทานอลจากพืชพื้นบ้าน 15 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ RK24, สายพันธุ์ RK32, สายพันธุ์ RK37 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64) และสายพันธุ์อ้างอิง (*Morganella morganii* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราและสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ แต่เมื่อศึกษาค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียทดสอบที่สามารถสร้างอิซทาไมนได้สูงสุด 2 ลำดับแรก พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อ *M. morganii* ATCC 25830 เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MIC และ MBC ต่อ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เท่ากับ 0.14 และ 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. morganii* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ได้น้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0-7.0 และ 6.0 ตามลำดับ ส่วนผลของอุณหภูมิในการบ่ม ปริมาณเกลือ และอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร ไม่ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ลดลง

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. morganii* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ในตัวอย่างปลาสด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ในทุกสภาวะที่ทำการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม โดยการเก็บรักษาปลาสดที่จุ่มด้วยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 15 วัน จึงสามารถนำสภาวะดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์และผลิตภัณฑ์ เพื่อลดอันตรายจากสารอิซทาไมนและยืดอายุการเก็บรักษา

Nongpanga Sangcharoen 2009: Effect of Some Essential Oils and Indigenous Plant Extracts Against Histamine-forming Bacteria Isolated from Scombroid Fish. Master of Science (Fishery Products), Major Field: Fishery Products, Department of Fishery Products. Thesis Advisor: Assistant Professor Pongtep Wilaipun, Ph.D. 169 pages.

Histamine poisoning in human usually caused by scombroid fish consumption. Histamine is produced by some bacteria contaminated in scombroid fish. The isolation of histamine-forming bacteria was carried out from shortbody mackerel, Eastern little tuna and Spanish mackerel. One hundred and sixty-six isolates of histamine-forming bacteria were collected from these samples and *Psychrobacter* sp. strain RK64 showed the highest level of histamine production in culture media.

Determination of antimicrobial activity against the isolated histamine-forming bacteria (strain RK24, strain RK32, strain RK37 and *Psychrobacter* sp. strain RK64) and reference histamine-forming strains (*Morganella morganii* ATCC 25830 and *Lactobacillus* sp. strain H15) of 11 essential oils and 15 ethanolic extracts from indigenous plants were performed. Essential oil of holy basil and ethanolic extract of roselle could inhibit all of 6 tested strains. However, determination of MIC and MBC against the 2 highest level of histamine producing strain indicated that lemongrass oil showed the highest inhibitory effect against *M. morganii* ATCC 25830 (MIC and MBC = 0.78 µg/ml) and *Psychrobacter* sp. strain RK64 (MIC and MBC = 0.14 and 0.17 µg/ml). Antimicrobial activity of lemongrass oil against *M. morganii* ATCC 25830 and *Psychrobacter* sp. strain RK64 was decreased in culture media at pH 6.0-7.0 and 6.0 respectively. In contrast, the influence of incubating temperature, salt content and food processing temperature had no effect on bacterial growth inhibition of lemongrass oil.

In addition, the antimicrobial activity of lemongrass oil against *M. morganii* ATCC 25830 and *Psychrobacter* sp. strain RK64 in shortbody mackerel keeping at different temperature were examined. Lemongrass oil could reduce the total bacteria count and total number of both histamine-forming strains in every treatment. Adding lemongrass oil to the sample and storage at 4°C could extend shelf-life of shortbody mackerel up to 15 days. Consequently, this condition could be applied for reduction of hazard from histamine and extending shelf-life of fish and fish products.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์เทพ วิลัยพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช รักสกุลไทย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรณา มาลาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ดร. จุฬามุกดาสนิท ประธานการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาริสา จาคูพรพิพัฒน์ อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญยะประภัสร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมงทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการทำงาน ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง สำหรับคุณตา คุณยาย คุณแม่ ที่ให้ความรักและกำลังใจ รวมทั้งสนับสนุนค่าใช้จ่ายในระหว่างการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

ประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแต่ คุณตา คุณยาย คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนให้มีความรู้จนถึงปัจจุบัน

นางพงา แสงเจริญ

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	44
สรุปและข้อเสนอแนะ	105
สรุป	105
ข้อเสนอแนะ	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	108
ภาคผนวก	124
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	125
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์สารอิสทามีน	128
ภาคผนวก ค การตรวจสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสของปลาทูสค	133
ภาคผนวก ง ตารางแสดงผลการทดลอง	135
ภาคผนวก จ บทคัดย่อของผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์	166
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	169

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของฮิสตามีนต่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย	6
2	ข้อกำหนดปริมาณฮิสตามีนในอาหารของประเทศต่าง ๆ	7
3	ปริมาณฮิสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์ประมงชนิดต่าง ๆ	8
4	สถิติการเกิดพิษจากสารฮิสตามีนในอาหาร	10
5	แบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนซึ่งพบในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์	14
6	พืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	22
7	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในเนื้อปลาทู ปลาอินทรี ปลาโอลาย และจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนเมื่อคัดแยกด้วยอาหาร modified Niven's medium	45
8	สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้จากปลาทู ปลาอินทรี และปลาโอลาย	46
9	สายพันธุ์แบคทีเรียซึ่งคัดเลือกได้จากปลากลุ่มสกอมบรอยด์ที่สามารถเพิ่มความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ หรือ HEB ได้ค่ามากกว่า 6.10	48
10	ปริมาณฮิสตามีนซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric method และ enzymatic analysis method	50
11	ประสิทธิภาพในการละลายน้ำมันหอมระเหยและผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของสารละลาย DMSO และ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	55
12	ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน	57
13	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพและความเข้มข้นที่ใช้ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน	62
14	ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลาย <i>M. organii</i> ATCC 25830 และ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	66
15	คะแนนความเข้มของกลิ่นตะไคร้ที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของปลาทูสดและปลาทูหนึ่งที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค1	การจำแนกระดับการไม่ยอมรับของตัวอย่างปลาหูสดโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส	134
ง1	ต้นทุนวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้และความเป็นกรดต่างที่สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HEB	136
ง2	จำนวน <i>M. organii</i> ATCC 25830 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ	142
ง3	จำนวน <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ	143
ง4	ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. organii</i> ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง	144
ง5	ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. organii</i> ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสตามีน	145
ง6	ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง	146
ง7	ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสตามีน	147
ง8	ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. organii</i> ATCC 25830	148
ง9	ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	149

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง10	ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. morgani</i> ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง	150
ง11	ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. morgani</i> ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสตามีน	151
ง12	ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง	152
ง13	ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสตามีน	153
ง14	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. morgani</i> ATCC 25830	154
ง15	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	155
ง16	ปริมาณ <i>M. morgani</i> ATCC 25830 และ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน	156
ง17	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของปลาทุสดที่จุ่มและไม่จุ่มในสารละลายแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่มีปริมาณเซลล์ต่างกัน	157
ง18	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทุสดที่มีและไม่มีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนและจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ	158
ง19	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C	159

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง20	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮีทามีนในปลาทูสคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C	160
ง21	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปลาทูสคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C	161
ง22	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปลาทูสคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C	162
ง23	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างในปลาทูสคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C	163
ง24	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างในปลาทูสคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C	164
ง25	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการไม่ยอมรับในปลาทูสคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ	165

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการเปลี่ยนฮิสทีดีนไปเป็นฮิสตามีนโดยเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลส	5
2	การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน	36
3	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างสารฮิสตามีนและไม่สร้างสารฮิสตามีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Niven's medium	44
4	เปรียบเทียบลำดับเบสบน 16s rDNA ของสายพันธุ์ RK64 และ <i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	53
5	ผลของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณ <i>M. morganii</i> ATCC 25830 และ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	64
6	ผลของสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณ <i>M. morganii</i> ATCC 25830 และ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	65
7	ผลของความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย <i>M. morganii</i> ATCC 25830	70
8	ผลของความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	71
9	ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย <i>M. morganii</i> ATCC 25830	73
10	ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	74
11	ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย <i>M. morganii</i> ATCC 25830	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสทามีนของแบคทีเรีย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	77
13	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสทามีนของแบคทีเรีย <i>M. organii</i> ATCC 25830	79
14	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสทามีนของแบคทีเรีย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	80
15	จำนวน <i>M. organii</i> ATCC 25830 และ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน	82
16	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนจากปลาทุสดที่จุ่มในสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนต่างกัน	83
17	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนจากปลาทุสดที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	84
18	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนจากปลาทุสดที่ปนเปื้อนด้วย <i>M. organii</i> ATCC 25830 และจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	85
19	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนจากปลาทุสดที่ปนเปื้อนด้วย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 และจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	85
20	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	89
21	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)	93
23	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	95
24	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	96
25	การเปลี่ยนแปลงของระดับการไม่ยอมรับในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	97
26	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและค่าความเป็นกรดต่างในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	99
27	การเปลี่ยนแปลงของระดับการไม่ยอมรับในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	100
28	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและค่าความเป็นกรดต่างในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)	101
29	การเปลี่ยนแปลงของระดับการไม่ยอมรับในปลาทุสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)	102

**ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิดในการยับยั้งการเจริญ
ของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งคัดแยกได้จากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์**

**Effect of Some Essential Oils and Indigenous Plant Extracts
Against Histamine-forming Bacteria Isolated from Scombroid Fish**

คำนำ

ปลาเป็นอาหารที่มีการนำเสียบได้ง่าย เนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีนโดยน้ำย่อยในตัวปลา และจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในปลา ทำให้ปลานำเสียบหรือเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว หากไม่มีการดูแลรักษาที่ดี นอกจากนี้ปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์ (scombroid) เช่น ปลาทู ปลาลัง ปลาโอ ปลาอินทรี ปลาสิกุน ปลาทูน่า ซึ่งมีโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีนในปริมาณสูง โดยกรดอะมิโนดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นฮิสตามีนผ่านกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันโดยเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่เจริญอยู่ในลำไส้ เหงือกและผิวหนังของปลา โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Lehane and Olley, 2000; Kim *et al.*, 2001)

สารฮิสตามีนอาจทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ โดยทำให้เกิดอาการแพ้ เกิดผื่นคัน คลื่นไส้ ปวดศีรษะ ท้องร่วง แสบร้อนในปากและปวดท้อง (Emborg *et al.*, 2005) การเกิดพิษจากฮิสตามีนในมนุษย์เกิดจากการรับประทานปลาที่มีสารดังกล่าวอยู่ ซึ่งพบว่าอันตรายจากฮิสตามีนมีผลกระทบต่อการค้าทั้งในประเทศและต่างประเทศเป็นอย่างมาก เนื่องจากปลาเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีการบริโภคภายในประเทศอย่างแพร่หลาย อีกทั้งมีการส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศในแบบแช่แข็งและเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปต่าง ๆ

ดังนั้น การยับยั้งการเจริญหรือหยุดกิจกรรมของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลส อาจช่วยลดอันตรายจากสารฮิสตามีนในเนื้อปลาลงได้ การใช้สารต้านจุลชีพถึงแม้จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่การใช้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง อาจทำให้จุลินทรีย์มีการพัฒนาตัวเองเพื่อต้านทานต่อสารต้านจุลชีพมากขึ้น นอกจากนี้สารต้านจุลชีพที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีอาจมีการตกค้างหรือเกิดอันตรายต่อผู้ใช้และผู้บริโภคได้ ในปัจจุบันสารต้านจุลชีพจากธรรมชาติ (natural antimicrobial substances) เช่น สารสกัดจากพืช และน้ำมันหอมระเหย

กำลังได้รับความสนใจและนำมาพัฒนาเพื่อใช้งานกันมากขึ้น ซึ่งพบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จากธรรมชาติเหล่านี้ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่งสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ที่มีจุดเด่นในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากเป็นส่วนประกอบในอาหารที่บริโภคกันอยู่แล้ว อีกทั้งหาได้ง่าย มีปริมาณมาก และพืชแหล่งกำเนิดของสารดังกล่าวสามารถขยายพันธุ์เองได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการนำน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น มาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอีสตามีน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดอีสตามีนในปลากลุ่มสคอมบรอยด์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนจากเนื้อปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์
2. เพื่อคัดเลือกชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนที่คัดเลือกได้
4. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนที่คัดเลือกได้
5. เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการลดปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนในแบบจำลองตัวอย่างอาหาร

การตรวจเอกสาร

ปลากลุ่มสคอมบรอยด์ จัดอยู่ในวงศ์ Scombridae พบได้ทั่วไปในทะเลเขตร้อนและอบอุ่น ทั้งในบริเวณชายฝั่งและนอกชายฝั่งทะเล โดยชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ปลาทูน่าโบนิโต (bonito) แมกเคอเรล (mackerel) สคิปแจ็ก (skipjack) เซอริ (saury) อัลบาคอร์ (albacore) สเปนนิชแมกเคอเรล (Spanish mackerel) เป็นต้น (มีทนา, 2545)

ปลากลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการค้าสินค้าประมงทั้งในและนอกประเทศ ภายในประเทศมีการค้าปลาเหล่านี้ ทั้งในรูปของปลาสดและผ่านการแปรรูป เช่น การทำเค็ม ทำแห้ง การบรรจุกระป๋อง แปรรูปเป็นอาหารพร้อมปรุง หรือการทำเป็นอาหารปรุงสำเร็จต่าง ๆ ส่วนการส่งออกไปยังต่างประเทศ นอกจากจะส่งออกในรูปแบบของปลาบรรจุกระป๋องแล้ว ยังมีการส่งออกเป็นปลาสดแช่แข็ง และผลิตภัณฑ์แปรรูปต่าง ๆ (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2549)

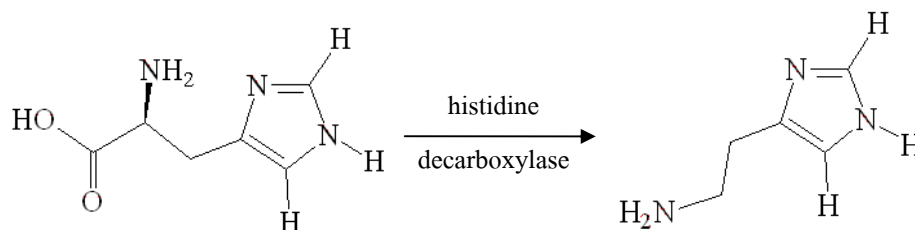
ในช่วงปี พ.ศ. 2546 ถึง 2551 ปลาทูน่าสคิปแจ็กและแอตแลนติกโบนิโตชนิดบรรจุกระป๋อง มีมูลค่าการส่งออกมากเป็นอันดับหนึ่งของการส่งออกสินค้าประมงของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2551 มีมูลค่าการส่งออกเท่ากับ 61,036.71 ล้านบาท คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 483,894.57 ตัน และยังมีสินค้าประมงประเภทปลาซาร์ดีน ซาร์ดีนเนลล่าและปลาบรอสลิงหรือปลาเปรตบรรจุภาชนะที่อากาศผ่านเข้าออกไม่ได้ ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกมากเป็นอันดับ 13 โดยมีมูลค่าเท่ากับ 2,759.68 ล้านบาท คิดเป็นปริมาณการส่งออกเท่ากับ 43,856.94 ตัน นอกจากนี้ยังมีปลาแมกเคอเรลบรรจุกระป๋อง เนื้อปลาคและเนื้อปลาแช่เยือกแข็ง รวมทั้งปลาทูน่าประเภทอื่น ๆ ที่มีมูลค่าการส่งออกอยู่ใน 20 อันดับแรกของการส่งออกสินค้าประมงในปี พ.ศ. 2551 (กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ, 2552) โดยมีประเทศผู้นำเข้าที่สำคัญ คือ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย แคนาดา อิตาลี เป็นต้น

แต่ในขณะเดียวกันพบว่าการบริโภคปลากลุ่มนี้อาจทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ โดยอันตรายจากปลากลุ่มนี้เกิดจากการบริโภคปลาที่มีฮิสตามีนในปริมาณมาก ซึ่งฮิสตามีนที่เกิดขึ้นนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร ชนิดของปลา เวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาปลา (Lopez-Sabater, 1996b) รวมทั้งปัจจัยในด้านสภาพแวดล้อม เช่น ฤดูกาล อุณหภูมิและความเค็มของน้ำ การดูแลคุณภาพความสดหลังการจับ และสภาพแวดล้อมในสถานที่จำหน่าย ส่วนเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดฮิสตามีนในปลาสด

ฮิสตามีนในปลา

ฮิสตามีนเป็นสารเอมีนที่ระเหยไม่ได้ (non-volatile amine) มักพบในปลาที่มีเนื้อสีคล้ำ (dark meat fish) โดยเฉพาะในปลากลุ่มสคอมบรอยด์ รวมทั้งปลาอื่น ๆ เช่น ปลาซาร์ดีน ปลาแฮร์ริง และสัตว์เลื้อยลูกค้ำยวม เช่น โลมา โดยในกล้ามเนื้อของสัตว์เหล่านี้จะมีกรดอะมิโนอิสระชนิด ฮิสทีดีน (free histidine) ในปริมาณสูงและแตกต่างกันตามชนิดของปลา (มัทนา, 2545) เช่น ปลาทูมี ปริมาณฮิสทีดีน 1,364 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของส่วนที่บริโภคได้ ปลาทูนามี 1,523 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปลาโอมี 646 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (กองโภชนาการ, 2544)

การย่อยสลายของฮิสทีดีนทำให้เกิดสารเอมีนชนิดฮิสตามีน กลไกการสร้างฮิสตามีนต้องอาศัยแบคทีเรียทำหน้าที่ดึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากกรดอะมิโนชนิดฮิสทีดีน โดยกระบวนการ decarboxylation (สุมณฑา, 2545) โดยเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลสจากแบคทีเรีย การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีดังสมการ



ภาพที่ 1 กลไกการเปลี่ยนฮิสทีดีนไปเป็นฮิสตามีน โดยเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลส

ที่มา: Messer (2000)

พิษของฮิสตามีน

พิษจากฮิสตามีนจัดเป็นการได้รับพิษจากสารเคมีที่มีอยู่ในอาหาร โดยเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีฮิสตามีนอยู่ในปริมาณที่มากพอ อาการที่เกิดขึ้น มักขึ้นอยู่กับระยะพักตัวที่อาจจะเป็นช่วงเวลานั้น ๆ เพียงไม่กี่นาทีจนถึงหลายชั่วโมง ภายหลังจากการบริโภคอาหารเข้าไป (Taylor, 1986)

ในผู้ป่วยบางรายอาการจะคงอยู่ไม่นานหรืออาจจะนานหลายชั่วโมง แต่ก็พบว่าในผู้ป่วยบางรายมีอาการคงอยู่หลายวัน (Taylor, 1986) พิษจากฮิสตามีนมักเรียกว่าพิษจากปลากลุ่มสคอมบรอยด์ เนื่องจากหลายครั้งที่การเจ็บป่วยเกิดจากการบริโภคปลากลุ่มสคอมบรอยด์ที่เน่าเสียเข้าไป เช่น ปลาทูน่าและปลาแมกเคอเรล แต่ในปัจจุบันก็พบการเกิดพิษจากฮิสตามีนในปลากลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ปลากลุ่มสคอมบรอยด์ด้วย เช่น แฮร์ริ่งและซาร์ดีน (Tsai *et al.*, 2005b) อาการที่เกิดจากฮิสตามีนมักไม่รุนแรง (Tsai *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008) โดยจะเกิดกับส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ผิวหนัง กระเพาะอาหารและลำไส้ การไหลเวียนของโลหิต และระบบประสาท ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของฮิสตามีนต่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย	อาการ
ผิวหนัง	ผื่นแดง ลมพิษ มีอาการบวมน้ำ เป็นรอยคล้ายไฟไหม้
กระเพาะอาหารและลำไส้	คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เสียดท้อง
การไหลเวียนของโลหิต	ความดันต่ำ
ระบบประสาท	ปวดศีรษะ สั่นเทา หน้าแดง เหงื่อออก ปวดแสบปวดร้อน คัน

ที่มา: Taylor (1986)

กลไกการเกิดพิษของฮิสตามีน เกิดจากการจับกับตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะ ซึ่งตัวรับฮิสตามีน (histamine receptor) มีทั้งหมด 4 ชนิดคือ H₁, H₂, H₃ และ H₄ พบได้ในกล้ามเนื้อเรียบ เยื่อหุ้มหัวใจ เนื้อเยื่อของระบบประสาทส่วนกลาง ต่อมไทมัส ม้าม ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ (Laboratory Center for Food and Agricultural Products Company Limited, 2006) เมื่อมีการได้รับสารฮิสตามีนผ่านการบริโภค บางครั้งก็ไม่ทำให้เกิดพิษ เนื่องจากในลำไส้ของคนมีเอนไซม์ที่ช่วยเปลี่ยนรูปของฮิสตามีนให้เป็นสารอื่น ช่วยป้องกันการดูดซึมสารฮิสตามีนไม่ให้เข้าสู่กระแสโลหิต เอนไซม์ที่ช่วยเปลี่ยนฮิสตามีนไปเป็นสารอื่น ได้แก่ diamine oxidase (DAO) และ histamine-N-methyltransferase (HMT) โดย DAO จะเปลี่ยนฮิสตามีนไปเป็น imidazoleacetic acid ส่วน HMT จะเปลี่ยนฮิสตามีนไปเป็น N-methylhistamine และมีการกำจัดออกผ่านกลไกการกำจัดของเสียของร่างกาย แต่พบว่าสารบางชนิดที่มีอยู่ในอาหารที่บริโภค อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ เช่น สาร เอมีนชนิด cadaverine, tyramine และ aminoguanidine ซึ่งเกิดขึ้นในอาหารที่เน่าเสีย รวมทั้งยารักษาโรคบางชนิด เช่น ยาต้านวัณโรค (isoniazid) (Taylor, 1986)

อิสตามีนเป็นสารที่ทนความร้อนสูง (จริยา, 2548; McLauchlin *et al.*, 2006) ความร้อนที่ใช้ในการประกอบอาหาร หรือในการผลิตอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ ไม่สามารถทำลายสารนี้ได้ รวมทั้งการแช่เยือกแข็ง การรมควัน หรือการทำเค็ม ซึ่งเป็นเพียงการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (Auerswald *et al.*, 2006) แต่ไม่สามารถทำลายพิษได้ อีกทั้งสารอิสตามีนอาจคงอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้เป็นระยะเวลานาน ดังเช่นผลการทดลองเก็บรักษาปลาป่นไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส พบว่าอิสตามีนสามารถคงอยู่ได้นานมากกว่า 3 ปี และสามารถคงอยู่ได้อย่างน้อย 3 เดือนที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส (Macan *et al.*, 2006) สำหรับปริมาณที่ทำให้เกิดพิษนั้น ยังไม่มีการศึกษาใดที่ได้ข้อสรุปที่แน่นอน แต่โดยทั่วไปมักพบการเกิดพิษเมื่อมีอิสตามีนมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Lehane and Olley, 2000)

มาตรฐานของปริมาณอิสตามีนในอาหาร

ประเทศต่าง ๆ ได้กำหนดปริมาณสูงสุดที่มีได้ของสารอิสตามีนในอาหารไว้แตกต่างกัน กรมประมงจึงได้รวบรวมเกณฑ์กำหนดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลส่งออกที่ต้องการส่งออกไปยังประเทศต่าง ๆ ไว้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อกำหนดปริมาณอิสตามีนในอาหารของประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ผลิตภัณฑ์	ปริมาณสูงสุดที่มีได้ (ppm)
ออสเตรเลีย	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	200
นิวซีแลนด์	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	200
สหภาพยุโรป	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	200
อิสราเอล	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	200
แคนาดา	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	100
จีน	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	100
สหรัฐอเมริกา (FDA)	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	50
รัสเซีย	ทูน่า, แซลมอน, แมกเคอเรล, แฮร์ริง	100
ประเทศอื่น ๆ	ทูน่า, ปลาที่มีฮิสทีดีนสูง, แมกเคอเรล, ชาร์ดีน, ซาบะ	100

ที่มา: กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (2552)

ปริมาณฮิสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์ประมง

ผลิตภัณฑ์ประมงหลายประเภทมีปลาเป็นวัตถุดิบ ดังนั้นจึงทำให้พบสารฮิสตามีนได้ในผลิตภัณฑ์ประมงต่าง ๆ ซึ่งนอกจากปลาสดแล้วฮิสตามีนยังสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์ประมงอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณฮิสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์ประมงชนิดต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	อ้างอิง
ปลาสด	ปลาโนก (snoek)	0.7 - >50.0	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	ปลากระโทงดาบ	0.8 - 3.9	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	ปลาทูน่าอัลบาคอร์	2.9 - 3.8	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	ปลาโอลาย	180.0 - 260.0	Korashy and Farag, 2005
	ปลากระบอก	70.0 - 150.0	Korashy and Farag, 2005
	ปลาหลังเขียว	130.0 - 190.0	Korashy and Farag, 2005
	ปลาอินทรี	390.0 - 500.0	Korashy and Farag, 2005
	ปลาโบนิโต	220.0 - 390.0	Korashy and Farag, 2005
	ปลาชาร์ดีน	180.0 - 270.0	Korashy and Farag, 2005
น้ำปลา	กึ่ง	6.8 - 257.8	Saaid <i>et al.</i> , 2009
	ไม่ระบุ	99.0 - 372.9	Saaid <i>et al.</i> , 2009
	ไม่ระบุ	45.0 - 1,220.0	Tsai <i>et al.</i> , 2006
	ไม่ระบุ	0.0 - 729.0	Stute <i>et al.</i> , 2002
	ไม่ระบุ	100.0 - 600.0	Brillantes, 1999
ปลาดุกแห้ง	ปลานวลจันทร์ทะเล	<1.0 - 5,449.0	Hsu <i>et al.</i> , 2009
	ปลานวลจันทร์ทะเล	616.0	Tsai <i>et al.</i> , 2007
	ปลาทูน่า	8,001.0	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	ไม่ระบุ	<1.0 - 195.0	Saaid <i>et al.</i> , 2009
กะปิ (paste)	กึ่ง	20.0 - 1,180.0	Tsai <i>et al.</i> , 2006
	ปลาเซอร์รี่	320.0	Miki <i>et al.</i> , 2005
	ไม่ระบุ	101.0 - 760.0	Tsai <i>et al.</i> , 2006

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	ปริมาณฮิสทามีน (ppm)	อ้างอิง
ปลา凍เค็ม	ปลาซาร์ดีน	27.0 - 251.0	Kuda <i>et al.</i> , 2007
	ปลาแมกเคอเรล	6.0 - 305.0	Kuda <i>et al.</i> , 2007
	ปลากะตัก	155.0 - 579.0	Mah <i>et al.</i> , 2002
ปลากระป๋อง	ปลาซาร์ดีน	1.5	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	ปลาทูน่า	1.0 - 187.0	Tsai <i>et al.</i> , 2005b
ปลาเค็ม	ปลาแฮร์ริง	0.0 - 47.0	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	ปลาแมกเคอเรล	70.1 - 120.2	Tsai <i>et al.</i> , 2005a
ปลาป่น	ปลาแมกเคอเรล,	167.3 - 1,279.3	Kose <i>et al.</i> , 2003
	ปลาคอด		
	ไม่ระบุ	76.2	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
ปลาแล่	ไม่ระบุ	12.5 - 288.0	Tsai <i>et al.</i> , 2004
ปลารมควัน	ปลาสน็อก (snoek)	0.8 - 36.3	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
เนื้อปลาแช่เยือกแข็ง	ปลากระโทงดาบ	889.0 - 2,937.0	Chang <i>et al.</i> , 2008
เนื้อปลาทอดปรุงรส	ปลาทูน่า	21.0 - 71.0	Yeh <i>et al.</i> , 2006

สถิติการเกิดพิษของฮิสทามีน

ฮิสทามีนที่เกิดขึ้นในอาหารนั้น ไม่สามารถใช้วิธีการตรวจสอบทางประสาทสัมผัสมาคาดคะเนระดับของฮิสทามีนได้ Lopez-Sabater *et al.* (1996a) ได้ทำการทดลองเก็บรักษาปลาทูน่าไว้ที่อุณหภูมิ 0, 8 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่าผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสให้การยอมรับในตัวอย่างปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสจนถึงวันที่ 12 ของการเก็บรักษา โดยที่ตัวอย่างปลาที่มีปริมาณฮิสทามีนต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดย FDA แต่ผลการตรวจสอบในตัวอย่างปลาทูน่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณฮิสทามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสแล้ว พบว่าผู้ทดสอบยอมรับตัวอย่างปลาถึงวันที่ 4 ของการเก็บรักษา แต่พบว่าตัวอย่างปลาทูน่ามีปริมาณฮิสทามีนสูงเกินกว่ามาตรฐานแล้ว แสดงให้เห็นว่าหากมีการนำปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิตู้เย็น) ไว้หลายวันมาบริโภคอาจทำให้ผู้บริโภคได้รับพิษจากสารฮิสทามีนได้ ส่วนผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในตัวอย่างปลาที่เก็บ

รักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าได้รับการยอมรับจนถึง 24 ชั่วโมงของระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยมีปริมาณของฮิสตามีนน้อยมากและปริมาณฮิสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับผลการทดลองของจิริยา (2548) ที่พบว่าการเก็บรักษาปลาทูและปลาชาร์คินที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณฮิสตามีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อปลาเสื่อมเสียมากขึ้น โดยถึงแม้ลักษณะทางประสาทสัมผัสอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แต่ปริมาณฮิสตามีนในปลาทูและปลาชาร์คินมีค่าสูงถึง 653 และ 514 ppm ตามลำดับ ในขณะที่การเก็บรักษาปลาทั้ง 2 ชนิดในน้ำแข็งจะมีปริมาณฮิสตามีนเกิดขึ้นน้อยมากคือ 2 ppm แม้ว่าปลาจะมีลักษณะทางประสาทสัมผัสที่บ่งบอกถึงการเน่าเสียแล้วก็ตาม เพราะฉะนั้นก่อนที่การเน่าเสียจะปรากฏให้เห็นได้ทางประสาทสัมผัส ฮิสตามีนในปลาที่ไม่ได้เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งก็สามารถสะสมอยู่ในอาหารมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดพิษ จึงทำให้พบผู้ป่วยซึ่งบริโภคอาหารที่มีฮิสตามีนแล้วเกิดอาการแพ้เนื่องจากพิษอยู่เสมอ ดังสถิติการเกิดพิษในช่วงปี ค.ศ. 1998-2006 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 สถิติการเกิดพิษจากสารฮิสตามีนในอาหาร

ปี	ประเทศ	สาเหตุของพิษ	อ้างอิง
1998	โครเอเชีย	ปลาป่น	Macan <i>et al.</i> , 2006
	สหรัฐอเมริกา	ทูน่าเบอร์เกอร์	Becker <i>et al.</i> , 2001
	สหรัฐอเมริกา	สลัดปลาทูน่า	Specht, 1998
	นิวซีแลนด์	ปลารมควันจากปลากระบอก, ทูน่า, Kahawai, Trevally, Oilfish	Fletcher <i>et al.</i> , 1998
2001	ไต้หวัน	ปลาแมกเคอเรลกระป๋อง	Tsai <i>et al.</i> , 2005b
2002	ญี่ปุ่น	ปลาชาร์คินแห้ง	Kanki <i>et al.</i> , 2004
	อังกฤษ	ปลาทูน่า	Attaran and Probst, 2002
2003	ญี่ปุ่น	เนื้อปลาเซอริบด	Miki <i>et al.</i> , 2005
	สหรัฐอเมริกา	ปลาอินทรีน้ำลึก	Feldman <i>et al.</i> , 2005
	แคนาดา	สลัดทูน่า	Predy <i>et al.</i> , 2003
	ออสเตรเลีย	ปลาทูน่าครีบลือ	Hall, 2003
2004	ไต้หวัน	ปลากระโทงดาบ	Chang <i>et al.</i> , 2008
	แอฟริกาใต้	ปลาหางเหลือง	Auerswald <i>et al.</i> , 2006
	เดนมาร์ก	ปลาทูน่ารมควัน	Emborg and Dalgaard, 2006

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ปี	ประเทศ	สาเหตุของพิษ	อ้างอิง
2004	เคนมาร์ก	เนื้อปลาทูน่าดองพริก	Emborg <i>et al.</i> , 2005
2005	อังกฤษ	ปลาแมกเคอเรล	Borade <i>et al.</i> , 2007
2006	ไต้หวัน	ซาลาเปาไส้ปลาทูน่า	Chen <i>et al.</i> , 2008
		ปลานวลจันทร์ทะเล	Tsai <i>et al.</i> , 2007
	สหรัฐอเมริกา	เนื้อปลาทูน่า	Davis and Henry, 2007

ปัจจัยที่ทำให้เกิดฮิสตามีน

ฮิสตามีนที่เกิดขึ้นในปลา ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ อุณหภูมิในการเก็บรักษา ปลาสด ปริมาณเกลือ ชนิดของปลา และชนิดของแบคทีเรีย (มัทนา, 2545; จริยา, 2548)

1. อุณหภูมิในการเก็บรักษาปลาสด

การเก็บรักษาปลาสดไว้ที่อุณหภูมิห้องจะทำให้ปริมาณฮิสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จากการทดลองของจริยา (2548) ซึ่งทำการเก็บรักษาปลาทูน่าและปลาซาร์ดีนไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผ่านไป 25 และ 23 ชั่วโมง ตามลำดับ ปลาทั้ง 2 ชนิดยังมีลักษณะทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับ แต่มีปริมาณฮิสตามีนสูงเกินกำหนด (จากน้อยกว่า 100 ppm เป็น 653 และ 514 ppm ตามลำดับ) ส่วนปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งมีปริมาณฮิสตามีนน้อยมาก แม้จะเก็บรักษาไว้นาน 19 วันแล้วก็ตาม สอดคล้องกับผลการทดลองเก็บรักษาปลากะตักโดยเก็บไว้ในน้ำแข็งและที่อุณหภูมิ 15 และ 35 องศาเซลเซียส (Rodtong *et al.*, 2005) พบว่าปลาที่เก็บในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณฮิสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็น 254 ppm เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาผ่านไป 8 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวอย่างปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งมีปริมาณฮิสตามีนเพียง 19 ppm แม้ระยะเวลาในการเก็บจะผ่านไปแล้ว 15 วัน นอกจากนี้การหมักน้ำปลาโดยใช้วัตถุดิบจากปลากะตักที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณฮิสตามีนมากที่สุด (2,007 ppm) เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งพบว่ามีปริมาณฮิสตามีนเพียง 14 และ 34.8 ppm ตามลำดับ (Yongsawatdigul *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับ Rossano *et*

al. (2006) ที่พบว่าปลาเกะดักที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณฮิสตามีนสูงถึง 1,163.3 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณฮิสตามีนเพียง 10 ppm รวมถึงผลการเก็บรักษาไข่และเนื้อปลาของปลาทูน่าอัลบาคอร์ (Periago *et al.*, 2003; Auerswald *et al.*, 2006) พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีปริมาณฮิสตามีนมากกว่าและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้น Kerr *et al.* (2002) จึงแนะนำว่าควรเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส เพื่อหลีกเลี่ยงการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮิสตามีน

2. ปริมาณเกลือ

ปริมาณเกลือมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฮิสตามีน ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณเกลือต่ำ ดังนั้นปริมาณฮิสตามีนที่สูงจึงมักพบในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำ Sanceda *et al.* (1999) ได้ทดลองศึกษาผลของปริมาณเกลือต่อปริมาณของสารฮิสตามีนในปลาซาร์ดีนสดโดยการเติมเกลือ 5, 10, 20 และ 30 % ลงในตัวอย่างปลา พบว่าเมื่อปริมาณของเกลือลดลง ทำให้มีฮิสตามีนเพิ่มมากขึ้น ปลาที่เติมเกลือ 5 และ 10 % แสดงลักษณะที่เน่าเสียมากกว่าปลาที่เติมเกลือ 20 และ 30 % สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kongpun and Suwansakornkul (2000) ที่พบว่าการหมักปลาอินทรีด้วยอัตราส่วนปลาต่อเกลือ 1:1 (โดยน้ำหนัก) มีปริมาณฮิสตามีนน้อยกว่าการหมักปลาด้วยอัตราส่วนปลาต่อเกลือเป็น 2:1 และ 3:1

3. ชนิดของปลา

เนื่องจากฮิสตามีนเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนฮิสระชนิดฮิสทีดีนในกล้ามเนื้อปลา ดังนั้นปริมาณฮิสตามีนที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยจึงขึ้นกับปริมาณฮิสทีดีนในกล้ามเนื้อปลาดูด้วย ซึ่งปลาต่างชนิดกันจะมีปริมาณฮิสทีดีนต่างกัน โดย Silva *et al.* (1998) ได้ศึกษาพบว่าปลาskipjack (Skipjack tuna) ซึ่งมีปริมาณฮิสทีดีนสูงกว่าปลาbigeye (Bigeye tuna) มีแนวโน้มที่จะพบฮิสตามีนสูงกว่าปลาbigeye นอกจากนี้เหงือกและเครื่องในของปลายังเป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากน้ำทะเล การล้างและควักไส้ออกจะช่วยลดปริมาณแบคทีเรียลงได้ ซึ่ง Kim *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณฮิสตามีนในปลาอัลบาคอร์ทั้งตัวและปลาที่ผ่านการตัดแต่งแล้ว โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าปลาทั้งตัวมีปริมาณฮิสตามีนสูงกว่าปลาที่ผ่านการตัดแต่งแล้ว เมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน อีกทั้งส่วนต่าง ๆ ของปลา ได้แก่ ส่วนหัว ลำตัว และส่วนหาง ก็มีปริมาณฮิสตามีนแตกต่างกัน ดังผลการ

ทดลองของ Lopez-Sabater *et al.* (1996a) ที่พบว่าส่วนลำตัวของปลาทูน่าที่เก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน มีปริมาณฮิสทามีนสูงสุด รองลงมาคือส่วนหัวและส่วนหางของปลาทูน่า ตามลำดับ

4. ชนิดของแบคทีเรีย

นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว อีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดฮิสทามีนในเนื้อปลาก็คือ จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลสได้ จากรายงานการศึกษาถึงฮิสทามีนส่วนใหญ่พบว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการทำให้เกิดฮิสทามีนคือ แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae (Kim *et al.*, 2000; Lehane and Olley, 2000) โดยชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสทามีนซึ่งพบในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสทามีนซึ่งพบในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์

วงศ์	ชนิดของแบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์ที่พบ	ประเทศ	อ้างอิง
Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>	ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2007
Bacillaceae	<i>Bacillus coagulans</i>	น้ำปลา, กะปิจากปลาและกุ้ง	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2006
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter braakii</i>	ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i>	ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Hsu <i>et al.</i> , 2009
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter youngae</i>	ปลากระดัก	ไทย	Rodtong <i>et al.</i> , 2005
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
		ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Hsu <i>et al.</i> , 2009
		ปลาโอลาย, ปลาอินทรี, ปลาโบนิโต, ปลาซาร์ดีน	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005
		ปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004
		ปลากระดัก	ไทย	Rodtong <i>et al.</i> , 2005
		ปลาแอมเบอร์แจ็ก, ปลาแมกเคอเรล, ปลาซันมะ, ปลาสเปนิชแมกเคอเรล	เกาหลี	Kim <i>et al.</i> , 2009
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Hsu <i>et al.</i> , 2009
		ปลาโอลาย, ปลาอินทรี	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005
		ปลาแมกเคอเรลเค็ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2005a
		ปลากระดัก	ไทย	Rodtong <i>et al.</i> , 2005
		เนื้อปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004
		ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
Enterobacteriaceae	<i>Hafnia alvei</i>	ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001

ตารางที่ 5 (ต่อ)

วงศ์	ชนิดของแบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์ที่พบ	ประเทศ	อ้างอิง
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ปลาตู้หน้าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
		เนื้อปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Hsu <i>et al.</i> , 2009
		ปลาโอลาย, ปลาอินทรี, ปลาซาร์ดีน	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005
Enterobacteriaceae	<i>Morganella morganii</i>	ปลาตู้หน้ารวมควีน	เดนมาร์ก	Emborg and Dalgaard, 2006
		ปลากระตัก	ไทย	Rodtong <i>et al.</i> , 2005
		ปลาแจ็กแมกเคอเรล	ชิลี	Torres <i>et al.</i> , 2002
		ปลาอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2000; Kim <i>et al.</i> , 2001
		ปลาโอลาย, ปลาหลังเขียว, ปลากระบอก, ปลาอินทรี, ปลาโบนิโต, ปลาซาร์ดีน	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea agglomerans</i>	ซาลาเปาไส้ปลาตู้หน้า	ไต้หวัน	Chen <i>et al.</i> , 2008
		เนื้อปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2005b
Enterobacteriaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	ปลาตู้หน้าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
		เนื้อปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004
Enterobacteriaceae	<i>Proteus penneri</i>	เนื้อปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004
Enterobacteriaceae	<i>Proteus vulgaris</i>	ปลากระตัก	ไทย	Rodtong <i>et al.</i> , 2005
		ปลากระบอก, ปลาอินทรี, ปลาโบนิโต	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005
		เนื้อปลากระโทงร่ม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004

ตารางที่ 5 (ต่อ)

วงศ์	ชนิดของแบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์ที่พบ	ประเทศ	อ้างอิง
Enterobacteriaceae	<i>Proteus vulgaris</i>	ปลาแมกเคอเรล	ชิลี	Torres <i>et al.</i> , 2002
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas putrefasciens</i>	ปลาแมกเคอเรล	ชิลี	Torres <i>et al.</i> , 2002
Enterobacteriaceae	<i>Serratia fonticola</i>	ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
Enterobacteriaceae	<i>Serratia liquefaciens</i>	ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สหรัฐอเมริกา	Kim <i>et al.</i> , 2001
Enterobacteriaceae	<i>Serratia marcescens</i>	ซาลาเปาไส้ปลาทูน่า	ไต้หวัน	Chen <i>et al.</i> , 2008
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter baumannii</i>	เนื้อปลากระโทงรม	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2004
		ปลาทูน่าอัลบาคอร์	สเปน	Ben-Gigirey <i>et al.</i> , 1999
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	เนื้อปลากระโทงดาบ	ไต้หวัน	Chang <i>et al.</i> , 2008
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus capitis</i>	ปลากระตักเค็ม	สเปน	Hernandez-Herrero <i>et al.</i> , 1999
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ปลากระตักเค็ม	สเปน	Hernandez-Herrero <i>et al.</i> , 1999
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus intermedius</i>	ปลากระตักเค็ม	สเปน	Hernandez-Herrero <i>et al.</i> , 1999
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Tsai <i>et al.</i> , 2007, Hsu <i>et al.</i> , 2009
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus xylosus</i>	ปลานวลจันทร์ทะเลตากแห้ง	ไต้หวัน	Hsu <i>et al.</i> , 2009
Vibrionaceae	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	ปลาทูน่ารมควัน	เดนมาร์ก	Emborg and Dalgaard, 2006
		ปลาชาร์ดินตากแห้ง	ญี่ปุ่น	Kanki <i>et al.</i> , 2004
Vibrionaceae	<i>Vibrio anguillarum</i>	ปลาโอลาย, ปลาหลังเขียว, ปลาอินทรี, ปลาโบนิโต, ปลาชาร์ดิน	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005
Vibrionaceae	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ปลาหลังเขียว, ปลาอินทรี, ปลาชาร์ดิน	อียิปต์	Korashy and Farag, 2005

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮิสตามีนของจุลินทรีย์

1. อุณหภูมิ

เมื่อไม่มีการใช้น้ำแข็งในการเก็บรักษาปลาสด แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิปานกลาง คือระหว่าง 10-47 องศาเซลเซียส จะสามารถเจริญและสร้างฮิสตามีนได้ในปริมาณสูง ดังเช่นผลการทดลองของ Rodtong *et al.* (2005) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อ *M. morgani*, *E. aerogenes* และ *P. vulgaris* ซึ่งคัดแยกได้จากปลากระดัก โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 0-55 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 15 และ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสารฮิสตามีนในตัวอย่างปลากระดักที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และไม่พบการเจริญที่อุณหภูมิ 0, 45 และ 55 องศาเซลเซียส จึงทำให้ไม่พบฮิสตามีนในตัวอย่างปลาที่ทำการทดลองเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีการทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. morgani* ซึ่งคัดแยกได้จากปลาอัลบาคอร์และ Chilean mackerel (Kim *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2002) พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญและสร้างฮิสตามีนได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยมีปริมาณฮิสตามีนสูงถึง 5,253 ppm นอกจากนี้เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งคัดแยกได้จากปลาอัลบาคอร์แช่เยือกแข็ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส (Ben-Gigirey *et al.*, 1999) แต่สร้างฮิสตามีนได้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณของฮิสตามีนเป็น 20.7 และ 21 ppm ตามลำดับ ซึ่งสนับสนุนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฮิสทีดอินดีคาร์บอกซิลเลสในแบคทีเรีย *P. phosphoreum* ที่คัดแยกจากปลาแมกเคอเรลที่เก็บในน้ำแข็ง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 30 และ 40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Morii and Kasama, 2004)

2. ความเป็นกรดต่าง

ความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฮิสทีดอินดีคาร์บอกซิลเลส โดยพบว่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 6.0 (Morii and Kasama, 2004) โดยเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์และฮิสตามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจะลดลง นอกจากนี้ Nawong *et al.* (2003) และ Rodtong *et al.* (2005) ได้ทดลองเลี้ยง *M. morgani*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris* และ *S. xylosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดต่างต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างระหว่าง 5-7 แต่สามารถสร้างฮิสตามีนได้สูงสุดใน

อาหารที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และปริมาณฮิสตามีนลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวที่คัดแยกได้จากปลา Chilean mackerel (Torres *et al.*, 2002)

3. ปริมาณเกลือ

แบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนจะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือต่ำ ดังผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. cloacae*, *P. agglomerans* และ *S. epidermidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือ 0.5 และ 3 % ของ Hernandez-Herrero *et al.* (1999) และ Tsai *et al.* (2005a) ซึ่งพบว่าปริมาณฮิสตามีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น แต่ไม่พบฮิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือเป็น 10 และ 20 % เช่นเดียวกับผลการทดลองในแบคทีเรีย *M. morgani*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris* และ *S. xylosus* ซึ่งสามารถสร้างฮิสตามีนได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือ 0.5 % และสร้างฮิสตามีนได้เล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือ 5 % (Nawong *et al.*, 2003) แต่จะไม่สร้างฮิสตามีนเลยเมื่อมีปริมาณเกลือ 10, 20 และ 25 % จึงสามารถใช้ปริมาณของเกลือเป็นปัจจัยในการควบคุมปริมาณฮิสตามีนได้

4. ระยะเวลาในการบ่ม

ปริมาณฮิสตามีนมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการบ่มคือ เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น ปริมาณฮิสตามีนจะลดลง โดยพบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย จะมีปริมาณฮิสตามีนสูงสุด เมื่อระยะเวลาในการบ่มเป็น 24-48 ชั่วโมง (Ben-Gigirey *et al.*, 1999) และปริมาณฮิสตามีนจะลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น รวมทั้งระยะเวลาในการบ่มยังมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฮิสทีดิลดีคาร์บอกซิเลส จากการทดลองบ่มเอนไซม์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 14, 17 และ 21 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เช่นเดียวกัน (Eitenmiller *et al.*, 1981) การที่ปริมาณฮิสตามีนลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น Wei *et al.* (1990) ได้อธิบายไว้ว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ histaminase ซึ่งสามารถย่อยฮิสตามีนได้

สารต้านจุลชีพที่พบในพืช

สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) เป็นสารประกอบเคมีที่ได้จากธรรมชาติหรือการสังเคราะห์ มีผลในการยับยั้งหรือฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (กมลชัย, 2547) ซึ่งนอกเหนือจากจุลินทรีย์แล้ว พืชก็เป็นแหล่งของสารต้านจุลชีพอีกแหล่งหนึ่ง ซึ่งสารต้านจุลชีพจากพืชส่วนใหญ่มักมีความปลอดภัยในการบริโภค เนื่องนำมาจากพืชที่บริโภคได้ และต่างจากสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งอาจมีไอโซเมอร์อื่นปะปนมา ทำให้เกิดอันตรายได้ เช่น ทำให้เกิดมะเร็ง เป็นต้น

ชนิดของสารต้านจุลชีพที่พบในพืชส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) (พรณิภา, 2542) ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์ในการช่วยป้องกันโรคจากจุลินทรีย์และแมลง บางชนิดช่วยในด้านของกลิ่นรส เช่น เทอร์พีนอยด์ บางชนิดมีผลต่อการเกิดเมล็ดสีของพืช เช่น ควิโนนและแทนนิน บางชนิดทำให้เกิดรสชาติ เช่น แคลป์ไซซินจากพริก (รัตนา, 2547; สรัญญา, 2549) อีกทั้งพืชเหล่านี้ยังใช้ประกอบเป็นอาหารของมนุษย์อีกด้วย โดยสารต้านจุลชีพที่พบในพืชมีดังนี้

1. สารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids)

เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดที่ได้มีการศึกษา คุณสมบัติของ alkaloids คือ มีไนโตรเจนอยู่ภายใน heterocyclic ring มักมีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น สารควินิน (quinine) จากเปลือกต้นชิงโคนา (*Cinchon succirubra* Pav.) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย สารมอร์ฟีน (morphine) จากยางฝิ่น (*Papaver somniferum* L.) ใช้ระงับปวดในการผ่าตัด แต่มีฤทธิ์ทำให้เสพติดได้ สารนิโคติน (nicotine) จากใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) มีฤทธิ์ฆ่าแมลง สารคาเฟอีน (caffeine) ในใบและเมล็ดชา (*Camellia sinensis*) มีฤทธิ์กระตุ้นประสาท ทำให้รู้สึกกระปรี้กระเปร่า

2. สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolics)

เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างที่เล็กที่สุดเป็น aromatic ring (C_6) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) คือ hydroxyl อย่างน้อย 1 หมู่ ประกอบด้วย

2.1 coumarins โครงสร้างหลักเป็นอนุพันธ์ของ phenylalanine มี substitute group ที่ตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของ pyrone ring และมักมี OH group มาเกาะที่ตำแหน่งที่ 7 มีฤทธิ์ทำลาย DNA, RNA, protein และ lipids ของสิ่งมีชีวิต

2.2 flavonoids มีโครงสร้างที่มาจาก aromatic nucleus ของ flavan (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วย 6 กลุ่มย่อย ได้แก่ chalcones aurones และ isomer คือ flavanones, flavonols, anthocyanins และ isoflavones เช่น luteolin จากต้นหมอน้อย (*Vernonia cinerea* Less.) มีฤทธิ์ลดการเกร็งของกล้ามเนื้อ และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

2.3 lignin เป็นสารประกอบที่เป็น polymer ของ heterogeneous phenylpropane ที่พบในพืช เป็นสารประกอบสำคัญ ทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงให้ผนังเซลล์พืช

2.4 lignan และ neolignan เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วย phenylpropane จำนวน 2 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น futoquinol จากพืชสกุลพริกไทย (*Piper chamaejasme*)

2.5 tannin เป็นสารพวก polyphenols มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน มีรสฝาด พบในพืชหลายชนิด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน แก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พืชที่มีสาร tannin เช่น เปลือกทับทิม

2.6 quinones สารกลุ่มนี้ที่พบในธรรมชาติ เป็นสารสี (pigment) ที่อยู่ในรูปของ benzo-, naphtho- และ anthraquinone มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ ทำให้ลำไส้มีการบีบตัวมากขึ้น ช่วยระบาย

2.7 stibenes เป็นสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ cinnamic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา เช่น stebenoids ที่สกัดได้จากรากของต้นหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib.)

3. น้ำมันหอมระเหย (essential oil)

พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว มีลักษณะเป็นน้ำมันระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิธรรมดา ประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีที่ซับซ้อน อาจจำแนกได้ตามชนิดขององค์ประกอบหลักได้เป็น น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก hydrocarbon, alcohol, aldehyde, ketone, phenol, phenolic ether, oxide และ ester เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยที่มีการนำมาใช้เพื่อด้านการเจริญของจุลินทรีย์คือ น้ำมันกานพลู (clove oil) จากดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) ใช้บรรเทาอาการปวดฟัน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ หรือน้ำมันไพลจากเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ฟกช้ำ แก้เคล็ดขัดยอก เป็นต้น

4. สารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วย isoprene มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบในกลุ่ม lipophilic มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ยกตัวอย่างเช่น diterpenoids พบในกะเพรา taxol จากเปลือกไม้ของพืชสกุลแทกซัส (*Taxus brevifolia* Nutt) ใช้เป็นยาต้านมะเร็ง bruceines A, B และ C มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรีย

5. สารประกอบกลุ่มไกลโคไซด์ (glycosides)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วน aglycone หรือ genin จับกับน้ำตาล glucose จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ สารกลุ่ม glycosides มีชื่อเรียกตามชนิดของ aglycone มีการจัดเป็นกลุ่มต่าง ๆ เช่น

5.1 saponin glycosides มี aglycone เป็น steroid หรือ triterpenoid เช่น glycyrrhizin เป็น triterpenoid saponin ที่ได้จากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านไวรัส หรือ asiaticoside ที่ได้จากต้นบัวบก (*Centella asiatica* (L) Urban) มีฤทธิ์เป็นยาฝาดสมาน ทำให้แผลหายเร็ว รักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก

5.2 anthraquinone glycosides มี aglycone เป็นอนุพันธ์ของ anthracene มีฤทธิ์เป็นยาระบายและยาล่าช้า เช่น sennoside-B จากใบและฝักของต้นมะขามแขก (*Cassia angustifolia* Vahl.) และ barbaloin จากใบของว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis* Mill) เป็นองค์ประกอบในยาคำ ใช้เป็นยาล่าช้า เป็นต้น

5.3 isothiocyanate glycosides เป็นสารประกอบ glycoside ที่ถูก hydrolysis ด้วย เอนไซม์ thioglucosidase มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น pterygospermin จาก มะรุม (*Moringa oleifer* Lam.) หรือ sinigrin พบในเมล็ดมัสตาร์ดดำ (*Brassica nigra* L.) เป็นต้น

ปัจจุบันนักวิจัยหลายท่านหันมาให้ความสนใจในการนำพืชสมุนไพรที่เป็นทรัพยากรในแต่ ละท้องถิ่นมาสกัดเพื่อใช้เป็นสารต้านจุลชีพทั้งในคน สัตว์ และพืช ซึ่งบางชนิดมีแนวโน้มที่จะนำมา พัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงได้ต่อไป โดยชนิดของพืชและสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านจุลชีพ กลุ่มต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 พืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้ ¹	สารต้านจุลชีพที่พบ	จุลินทรีย์เป้าหมาย ²	อ้างอิง
<i>Allium sativum</i>	garlic (กระเทียม)	ND	allicin, diallyl disulfide	VP	Yano <i>et al.</i> , 2006
<i>Boesenbergia pandurata</i>	fingerroot (กระชาย)	EO	camphor, 1,8-cineol, trans-geraniol,	LM, STM	Thongson, 2005
<i>Cinnamomum cassia</i>	Chinese cinnamon (อบเชยจีน)	B, L	cinnamaldehyde, eugenol	ECO, LM, SA, SH	Oussalah <i>et al.</i> , 2007
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon (อบเชย)	EO	cinnamaldehyde	BS, KP, SA	Prabuseenivasan <i>et al.</i> , 2006
<i>Curcuma longa</i> L.	turmeric (ขมิ้นชัน)	RH	β -tumerone	EC, SA	ทิวาพร และ วลัยรัตน์, 2549
<i>Cymbopogon citrates</i> Stapf.	lemongrass (ตะไคร้)	EO	geraniol	AF, AN, AP, EC, LC, LM, LP, SA, STM	ปทุม และคณะ, 2550

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้ ¹	สารต้านจุลชีพที่พบ	จุดอินทรีย์เป้าหมาย ²	อ้างอิง
<i>Garcinia mangostana</i>	mangosteen (มังคุด)	ND	mangostin	PRA, STE	Chomnawang <i>et al.</i> , 2005
<i>Helichrysum italicum</i>	immortelle	FL	flavonoids, terpenes	AFU, AN, BS, CA, CS, CT, EC, KP, LM, PEN, PRA, PSA, PV, SA, SE, SM	Nostro <i>et al.</i> , 2000
<i>Heracleum sphondylium</i> L.	hogweed	EO	1-octanol, octyl butyrate	BM, CA, EA, EC, KP, LM, PS, PSA, PV, SA, STE, STM, XC, YE	Iscan <i>et al.</i> , 2003
<i>Nepeta cataria</i>	catnip	P	flavonoids, terpenes	AFU, AN, BS, CA, CS, CT, EC, FO, KP, LM, PEN, PRA, PSA, PV, SA, SE, SM	Nostro <i>et al.</i> , 2000
<i>Ocimum basilicum</i> L.	holy basil (กะเพรา)	L	eugenol	PSA	Nascimento <i>et al.</i> , 2000
<i>Phytolacca dodecandra</i>	endod (สะเดา)	L	flavonoids, terpenes	AFU, AN, BS, CA, CS, CT, EC, FO, KP, LM, PEN, PRA, PSA, PV, SA, SE, SM	Nostro <i>et al.</i> , 2000
<i>Pinus ponderosa</i>	pine (สน)	EO	β -pinene, α -pinene, germacrene	FC, FP, FS	Krauze-Baranowska <i>et al.</i> , 2002
<i>Piper betle</i>	betal (พญ)	L	eugenol	EC, LA, LPE, PA, SA, SD, ST, STM	วาทินี, 2546
<i>Punica granatum</i>	pomegranate (ทับทิม)	SH	punicine, granatonine, granatin, tannin	BC, BS, EC, ECO, KP, PSA, PV, SA, ST, VP	Nimri <i>et al.</i> , 1999; Prashanth <i>et al.</i> , 2001; Voravuthikunchai <i>et al.</i> , 2004
<i>Salvia officinalis</i> L.	sage	EO	α -thujone, camphor, 1,8-cineole	AN, BS, EC, ECO, PF, PM, PV, SA, SE, SM, STM, YE	Miladinovic and Miladinovic, 2000; Marino <i>et al.</i> , 2001

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วน ที่ใช้ ¹	สารต้าน จุลชีพที่พบ	จุลินทรีย์เป้าหมาย ²	อ้างอิง
<i>Satureja laxiflora</i>	savory	EO	thymol	AN, CA, EF, KP, SAC	Sonboli <i>et al.</i> , 2004
<i>Syzygium aromaticum</i>	clove (กานพลู)	DB, EO, ND	eugenol, terpenoid	CA, EA, EC, KP, PR, PSA, SA, SC, SH, VP	ศวรรณี และคณะ, 2550, Nascimento <i>et al.</i> , 2000; Yano <i>et al.</i> , 2006
<i>Teucrium montanum</i>	mountain germander	EO	δ-cadinene	AC, AT, BM, BS, ENC, ERC, FO, KP, PF, PG, PP, PR, PSA	Vukovic <i>et al.</i> , 2007

หมายเหตุ ¹B = เปลือกต้น, DB = ดอกแห้ง, EO = น้ำมันหอมระเหย, FL = ดอก, L = ใบ, P = ต้น,
RH = เหง้า, SH = เปลือกผล, ND = ไม่ระบุ

²AC = *Azotobacter chlorococcum*, AF = *Aspergillus flavus*, AFU = *Aspergillus fumigatus*, AN = *Aspergillus niger*, AP = *Aspergillus parasiticus*, AT = *Agrobacterium tumefaciens*, BC = *Bacillus cereus*, BM = *Bacillus mycoides*, BS = *Bacillus subtilis*, CA = *Candida albicans*, CS = *Clostridium sporogenes*, CT = *Candida tropicalis*, EA = *Enterobacter aerogenes*, EC = *Escherichia coli*, ECO = *Escherichia coli* O157:H7, EF = *Enterococcus faecalis*, ENC = *Enterobacter cloacae*, ERC = *Erwinia carotovora*, FC = *Fusarium culmorum*, FO = *Fusarium oxysporum*, FP = *Fusarium poae*, FS = *Fusarium solani*, KP = *Klebsiella pneumoniae*, LA = *Lactobacillus sp.*, LC = *Lactobacillus cellobiosus*, LM = *Listeria monocytogenes*, LP = *Lactobacillus plantarum*, LPE = *Lactobacillus pentosus*, PA = *Pediococcus acidilactici*, PEN = *Penicillium sp.*, PF = *Pseudomonas fluorescens*, PG = *Pseudomonas glycinea*, PM = *Proteus mirabilis*, PP = *Pseudomonas phaseolicola*, PR = *Proteus spp.*, PRA = *Propionibacterium acnes*, PS = *Pseudomonas syringae*, PSA = *Pseudomonas aeruginosa*, PV = *Proteus vulgaris*, SA = *Staphylococcus aureus*, SAC = *Saccharomyces cerevisiae*, SC = *Salmonella Choleraesuis*, SD = *Salmonella Derby*, SE = *Salmonella Enteritidis*, SH = *Shigella spp.*, SM = *Serratia marcescens*,

ST= *Salmonella Typhi*, STE = *Staphylococcus epidermidis*, STM = *Salmonella Typhimurium*, VP= *Vibrio parahaemolyticus*, XC = *Xanthomonas campestris*,
 YE = *Yersinia enterocolitica*

ในระบบ Hazard analysis critical control point (HACCP) ขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้กำหนดให้ขั้นตอนการรับวัตถุดิบปลาเป็นจุดควบคุมวิกฤต (critical control point) ที่ใช้ในการควบคุมอันตรายที่เกิดจากฮิสทามีน (จรีชา, 2548) จากที่กล่าวมาแล้วในช่วงต้นจะเห็นได้ว่าสารต้านจุลชีพจากพืชเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการนำมาใช้ในการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ อันจะส่งผลให้สามารถควบคุมปริมาณฮิสทามีนได้ โดยอาจใช้ร่วมกับการควบคุมปัจจัยในการเกิดฮิสทามีนที่ผู้ผลิตสามารถทำได้ เช่นการควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาปลา ดังนั้นการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นบ้านบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนซึ่งคัดแยกได้จากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์ จึงเป็นการชี้ให้เห็นถึงแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ประมง ทั้งในด้านของชนิดพืชที่มีประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ควรนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ซึ่งอาจรวมถึงแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีน ซึ่งไม่เพียงแต่การนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ประมงที่มีปลา สคอมบรอยด์เป็นวัตถุดิบได้เท่านั้น หากยังเป็นแนวทางให้มีการนำไปใช้ในการศึกษาในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทอื่น ๆ อีกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบปลา

ปลาที่นำมาใช้เพื่อการคัดเลือกแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฮิสตามีนเป็นปลาในวงศ์ Scombroid ได้แก่ ปลาอินทรี (Spanish mackerel; *Scomberomorus commerson*) ปลาหู (Shortbody mackerel; *Rastrelliger brachysoma*) ปลาโอลาย (Eastern little tuna; *Euthynnus affinis*) ซึ่งซื้อจากตลาดสด สะพานใหม่ กรุงเทพฯ และนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth, Merck)
- 2.2 Fish juice extract (FJ) (ภาคผนวก ก)
- 2.3 Histamine evaluation broth (HEB) (ภาคผนวก ก)
- 2.4 modified Niven's medium (mNM) (ภาคผนวก ก)
- 2.5 Plate count agar (PCA, Merck)
- 2.6 Tryptic soy agar (TSA, Merck)
- 2.7 Tryptic soy broth (TSB, Merck)
- 2.8 Tryptone (Difco)
- 2.9 Yeast extract (BBL)

3. สารเคมี

- 3.1 acetic acid (BDH)
- 3.2 amberlite CG-50 weakly acidic cation exchanger (Sigma)
- 3.3 *p*-bromoaniline (Fluka)
- 3.4 bromocresol purple (Fluka)
- 3.5 calcium carbonate (Unilab)

- 3.6 diamine oxidase from porcine kidney (Sigma)
- 3.7 dimethylsulfoxide (Riedel-deltaen)
- 3.8 ethyl alcohol (Carlo Erba)
- 3.9 D-glucose anhydrous (Fisher Chemicals)
- 3.10 glycerol (BDH)
- 3.11 histamine (2-[4-imidazolyl] ethylamine) dihydrochloride (Sigma)
- 3.12 L-histidine monohydrochloride monohydrate (Fluka)
- 3.13 hydrochloric acid (J.T. Baker)
- 3.14 hydrogen peroxide (Carlo Erba)
- 3.15 leucocrystal violet (Sigma)
- 3.16 methanol (Carlo Erba)
- 3.17 peroxidase type VI from horse radish (Sigma)
- 3.18 potassium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem)
- 3.19 potassium hydroxide pellets (Carlo Erba)
- 3.20 di-potassium hydrogen phosphate (Riedel-dehaen)
- 3.21 sodium acetate (Merck)
- 3.22 sodium carbonate anhydrous (Fluka)
- 3.23 sodium chloride (BDH)
- 3.24 sodium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem)
- 3.25 di-sodium hydrogen orthophosphate (BDH)
- 3.26 di-sodium hydrogen phosphate (May&Baker)
- 3.27 sodium nitrite (BDH)
- 3.28 tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride (Merck)
- 3.29 trichloroacetic acid (Carlo Erba)

4. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ
- 4.2 เครื่องตีผสมตัวอย่าง (Seward รุ่น BA 7021, England)
- 4.3 เครื่องผสมอาหารในหลอดทดลอง (Vortex Genie 2 รุ่น G 560 E, USA)
- 4.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP 3100 S, Germany)

- 4.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND รุ่น GR-200, Japan)
- 4.6 เครื่องวัดความเป็นกรดค่า (Metrohm รุ่น 744, Switzerland)
- 4.7 ตู้อบฆ่าเชื้อ (Sibata รุ่น SAO-600, Japan)
- 4.8 หม้อนิ่งฆ่าเชื้อระบบความดัน (Hirayama รุ่น 240/300 MIV, Japan)
- 4.9 ตู้บ่มเชื้อ (Mettmert รุ่น 600, Germany)
- 4.10 เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Suntex รุ่น 560, Taiwan)
- 4.11 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu รุ่น Pharma Spec UV-1700, Japan)
- 4.12 เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Hettich รุ่น Universal 32 R, Germany)
- 4.13 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH-2, Japan)
- 4.14 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand)
- 4.15 เครื่องอบลมร้อน (WTB Binder รุ่น F240, Germany)
- 4.16 เครื่องกลั่นสารละลายระบบสุญญากาศ (Buchi Rotavapor รุ่น R-124, Germany)
- 4.17 เครื่องหาความชื้นระบบอินฟราเรด (Sartorius รุ่น MA40, Germany)
- 4.18 เครื่องเขย่า (GFL รุ่น 3500, Germany)
- 4.19 เครื่องปั่นความเร็วสูง (Kinematica AG รุ่น Reco, Switzerland)

5. สายพันธุ์แบคทีเรียอ้างอิง และอาหารเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์แบคทีเรียอ้างอิงที่สามารถสร้างฮิสตามีนซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง ได้แก่ *M. morgani* ATCC 25830 จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. วรณา มาลาพันธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียอ้างอิงดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม yeast extract ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (TSB-YE) และ MRS broth ตามลำดับ บ่มแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน

6. พืชพื้นบ้าน

- 6.1 กระเจี๊ยบแดง (roselle, *Hibiscus sabdariffa* Linn.) ส่วนที่ใช้ : ใบประดับและกลีบเลี้ยง
- 6.2 กระจ่าง (fingerroot, *Boesenbergia rotunda* Linn.) ส่วนที่ใช้ : เหง้าและราก

- 6.3 กระถิน (lead tree, *Leucaena glauca* Benth.) ส่วนที่ใช้ : ใบ
- 6.4 กระเทียม (garlic, *Allium sativum* Linn.) ส่วนที่ใช้ : กลีบ
- 6.5 กัลย (banana, *Musa sapientum*) ส่วนที่ใช้ : ผลดิบ
- 6.6 ข่า (galanga, *Alpinia officinarum* Linn. Swartz.) ส่วนที่ใช้ : เหง้า
- 6.7 แคน (vegetable humming bird, *Sesbania grandiflora* L. Pers.) ส่วนที่ใช้ : ยอดอ่อน
- 6.8 ชะพลู (wild betel, *Piper sarmentosum* Roxb.) ส่วนที่ใช้ : ใบ
- 6.9 บัวบก (Indian pennywort, *Centella asiatica* L. Urban.) ส่วนที่ใช้ : ทั้งต้น
- 6.10 ผักโหม (amaranth, *Amaranthus gracilis* Desf.) ส่วนที่ใช้ : ทั้งต้น
- 6.11 ฟ้าทะลายโจร (the creat, *Andrographis paniculata* Burm. F. Ness.) ส่วนที่ใช้ : ใบ และลำต้น
- 6.12 แมงลัก (hairy basil, *Ocimum americanum* Linn.) ส่วนที่ใช้ : ใบ
- 6.13 ยอ (Indian mulberry, *Morinda citrifolia* Linn.) ส่วนที่ใช้ : ใบ
- 6.14 ลูกใต้ใบ (egg woman, *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn.) ส่วนที่ใช้ : ทั้งต้น

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. นันทวัน บุญยะ-
ประภัสร์ ภาควิชาเภสัชวินิฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และชื่อจากบริษัท
อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด ซึ่งสกัดโดยใช้กระบวนการกลั่นด้วยไอน้ำ รวม 11 ชนิด
ประกอบด้วย

- 7.1 น้ำมันหอมระเหยจากกระชาย (lesser galanga, *Boesenbergia rotunda* Linn.)
- 7.2 น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (holy basil, *Ocimum sanctum* Linn.)
- 7.3 น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน (turmeric, *Curcuma longa* Linn.)
- 7.4 น้ำมันหอมระเหยจากข่า (galanga, *Alpinia galanga* Linn. Swartz.)
- 7.5 น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (lemongrass, *Cymbopogon citrates* DC. Stapf.)
- 7.6 น้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง (garva leaf, *Psidium guajava* Linn.)
- 7.7 น้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำ (black pepper, *Piper nigrum* Linn.)
- 7.8 น้ำมันหอมระเหยจากพลู (betal vine, *Piper betle* Linn.)
- 7.9 น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (kaffir lime leaf, *Citrus hystrix* DC.)
- 7.10 น้ำมันหอมระเหยจากผลมะกรูด (kaffir lime, *Citrus hystrix* DC.)

7.11 น้ำมันหอมระเหยจากโหระพา (sweet basil, *Ocimum basilicum* Linn.)

วิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฮิสทามีนจากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์

1.1 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อที่ใช้สำหรับตีปนอาหาร เติมน้ำเกลือละลาย normal saline (0.85% sodium chloride) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร และนำเข้าเครื่องตีปนอาหาร (stomacher) เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างที่ได้ลงครั้งละ 10 เท่า ด้วยสารละลาย normal saline จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี spread plate โดยเปิดตัวอย่างในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่แห้ง โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณและรายงานผลของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเป็น logCFU/g

1.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนตามวิธีของ Kim *et al.* (2001)

หลังจากนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมดตามข้อ 1.1 แล้ว สุ่มเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาปลูกเชื้อแบบจุด (spot inoculate) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Niven's medium (mNM) (ภาคผนวก ก) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีสีม่วงหรือสีฟ้า และมีโซนสีม่วงล้อมรอบ มาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยการนำมา streak บนผิวหน้าอาหาร TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อจากคุณสมบัติในการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ รวมถึงการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตะเลส

1.3 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

1.3.1 เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดสอบเป็นประจำ โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 1.2 มา streak บนผิวหน้าเอียงของอาหาร TSA ที่บรรจุในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อซ้ำทุก 1 เดือน

1.3.2 เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้เป็นเวลานาน โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 1.2 ลงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปิเปิดเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลวมา 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอด Eppendorf นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง เทน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสออก แล้วเติมอาหาร TSB ที่ผสม glycerol จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 35% โดยปริมาตร ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์ของเชื้อบริสุทธิ์กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4 การทดสอบยืนยันการสร้างฮิสตามีนของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอายุ 18 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหาร TSB-YE บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปิเปิดเชื้อที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Fish juice extract (FJ) (Taylor *et al.*, 1979) และ Histamine evaluation broth (HEB) (Kim *et al.*, 2001) (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงอมม่วงเป็นสีม่วงเข้ม แสดงว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนฮิสทิดีน ไปเป็นฮิสตามีนได้ รวมถึงวัดค่าความเป็นกรดค้างที่เปลี่ยนแปลงไป

2. การตรวจหาปริมาณสารฮิสตามีนซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สร้างขึ้น

2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารฮิสตามีน

ปิเปิดเชื้อบริสุทธิ์ที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10⁵ CFU/ml จากอาหารเหลว TSB-YE ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว FJ และ HEB ที่ไม่มี 0.002% bromocresol purple (HE) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป

ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสไว้ใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การตรวจหาปริมาณฮิสตามีนตามวิธี colorimetric method (ดัดแปลงจาก Hardy and Smith, 1976 โดยการใส่สารฮิสตามีนที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนสารฮิสตามีนที่สกัดได้จากเนื้อปลา)

2.2.1 ปิเปตส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.1 มา 10 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลาย 2.5% trichloroacetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลาย 1 M potassium hydroxide

2.2.2 เตรียม ion exchange column โดยซังเรซิน Amberlite-CG 50 ซึ่งเป็นเรซินชนิด weakly acidic cation exchange resin จำนวน 1 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 M acetic acid กับ 0.2 M sodium acetate ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ซึ่งจะได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.63) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุส่วนผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 12 มิลลิเมตร ล้างเรซินที่บรรจุลงในคอลัมน์แล้วด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิมปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฮิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างแล้วจากข้อ 2.2.1 ผ่านคอลัมน์ แล้วล้างเรซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จะฮิสตามีนออกจากเรซินด้วยสารละลาย 0.2 M hydrochloric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ในขั้นตอนนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารฮิสตามีนในขั้นตอนต่อไป

2.2.4 ปิเปตตัวอย่างสารละลายที่ได้จากข้อ 2.2.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 5% sodium carbonate ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารที่ทำให้เกิดสี (diazotizing) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร โดยต้องวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังจากเติมสารที่ทำให้เกิดสีแล้ว 10 นาที แต่ไม่เกิน 20 นาที และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นชุดควบคุม

2.3 การหาปริมาณของสารฮิสตามีนโดยวิธี enzymatic histamine analysis method (Kim *et al.*, 2001) มีวิธีการดังนี้

2.3.1 ปิเปตส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.1 มา 1.5 มิลลิลิตร เติม 0.15 M phosphate buffer 1 มิลลิลิตร, 0.35 u/ml diamine oxidase 0.5 มิลลิลิตร, 17.5 u/ml horse radish peroxidase 0.5 มิลลิลิตร และ 0.5 mg/ml leucocrystal violet 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายฮิสตามีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นระหว่าง 3-30 ppm โดยใช้ FJ และ HE ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นชุดควบคุม

3. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำสายพันธุ์แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างฮิสตามีนซึ่งคัดเลือกได้ มาจำแนกชนิดโดยการศึกษาลำดับเบสของ 16s rDNA ขนาด 500 base pairs โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ Molecular Informatic Laboratory ประเทศฮ่องกง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16s rDNA ของสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานในฐานข้อมูล (Genebank database) ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

4. การเตรียมสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

4.1 การเตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้ในการทดสอบ

ละลายน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดด้วยสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 50, 75 และ 100% กับสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 50, 75 และ 100% ในอัตราส่วน น้ำมันหอมระเหยต่อ DMSO ต่อ ethanol เป็น 1:3:3 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยทำการผสมสารละลาย DMSO กับน้ำมันหอมระเหยให้ละลายดีก่อน แล้วจึงเติมสารละลาย ethanol และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อดูการละลายของน้ำมันหอมระเหยในสารละลายผสม

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของสารละลายผสมระหว่าง DMSO และ ethanol ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย โดยทำการ swab เชื้อแบคทีเรียทดสอบอายุ 18 ชั่วโมง (มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 CFU/ml) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำหรับแบคทีเรียทดสอบอื่น ๆ หยดสารละลายผสมดังกล่าวปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกความเข้มข้นของสารละลาย DMSO และ ethanol ที่ให้ผลการละลายของน้ำมันหอมระเหยดีที่สุด และไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ เพื่อใช้ในการละลายน้ำมันหอมระเหยต่อไป

4.2 การเตรียมสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

นำพืชพื้นบ้านมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (Voravuthikunchai *et al.*, 2004) นำไปบดด้วยเครื่องบด ชั่งตัวอย่างพืชพื้นบ้านที่บดแล้วน้ำหนัก 10 กรัม เติมสารละลาย 50% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นสารละลายระบบสุญญากาศ เก็บผงของสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งคัดเลือกได้

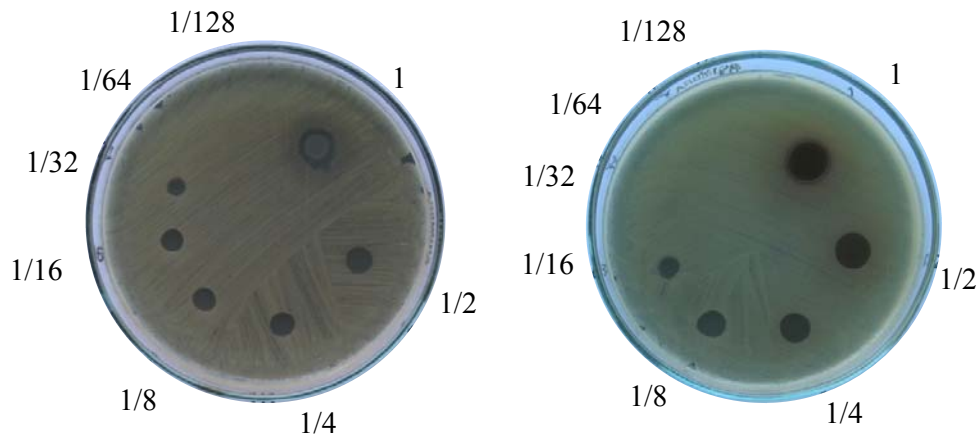
5.1 การคัดเลือกชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพขึ้นต้น

เจือจางน้ำมันหอมระเหยด้วยสารละลายผสมระหว่างสารละลาย DMSO และสารละลาย 75% ethanol ในอัตราส่วนน้ำมันหอมระเหยต่อสารละลาย DMSO และ 75% ethanol เป็น 1:3:3 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 142.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากพืชพื้นบ้านนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น โดยให้ความเข้มข้นเท่ากับ 5,000 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านกระดาษกรองแบคทีเรียที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน

หยคน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 ไมโครลิตร และสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำหรับแบคทีเรียทดสอบอื่น ๆ ซึ่งทำการ swab ด้วยแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่มีอายุ 18 ชั่วโมง (มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 CFU/ml) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายผสมของน้ำกลั่น DMSO และ 75% ethanol ที่ปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุมของน้ำมันหอมระเหย และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุมของสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน ตรวจสอบวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่แสดงการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น แล้วคัดเลือกชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone มากที่สุดมาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5.2 การทดสอบหาค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของสารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบจากความเข้มข้นเริ่มต้นลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปิเปตสารละลายน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านในแต่ละความเจือจางปริมาตร 5 และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หรือ TSA ที่เกลี่ย (swab) ด้วยสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 18 ชั่วโมง (มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 CFU/ml) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบดูระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพต่ำสุดที่ทำให้เกิด inhibition zone จากนั้นนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพเป็นยูนิิตต่อมิลลิลิตร (AU/ml) (Mayr-Harting *et al.*, 1972) โดยใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของสารต้านจุลชีพที่ยังสามารถสังเกตเห็นผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ (inhibition zone) ในการคำนวณหาค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพ ดังแสดงในภาพที่ 2



ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพ = ค่าส่วนกลับของความเจือจาง x [1,000/ปริมาตรของสารต้านจุลชีพที่ใช้ (μl)]
 ดังนั้น

น้ำมันหอมระเหย

ปริมาตรที่ใช้คือ 5 μl

ค่ากิจกรรมของน้ำมันหอมระเหย

$$= (32/1) \times (1,000/5)$$

$$= 6,400 \text{ AU/ml}$$

สารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

ปริมาตรที่ใช้คือ 10 μl

ค่ากิจกรรมของสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

$$= (16/1) \times (1,000/10)$$

$$= 1,600 \text{ AU/ml}$$

ภาพที่ 2 การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

6. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่สามารถยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration; MIC) และฆ่าทำลายแบคทีเรียทดสอบ (minimal bactericidal concentration; MBC)

คัดเลือกน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่มีค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพสูงสุดมาศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลายแบคทีเรียที่สร้างอิสรามีนด้วยวิธี broth dilution method (Nimri *et al.*, 1999) โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 18 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านละลายอยู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยให้มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 5×10^3 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าความเข้มข้น

ต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียคือมีค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 0.05 เป็นค่า MIC จากนั้นนำมา นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและรายงานผลเป็นค่า logCFU/ml โดยค่า MBC คือความ เข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

7. การศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยใน การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้

7.1 ความเป็นกรดต่าง

เติมน้ำมันหอมระเหยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MBC ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6 แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย สารละลาย 4N hydrochloric acid และ 4N sodium hydroxide ให้มีค่าเท่ากับ 5, 5.7, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 18 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอม ระเหยและปรับค่าความเป็นกรดต่างแล้ว โดยให้มีปริมาณของเชื้อสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 5×10^3 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการเจริญของ แบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วัดค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการ เจริญของแบคทีเรีย และมีการเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงกว่า 5.7 ด้วยวิธี colorimetric method และนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total viable count; TVC) โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวน โคโลนี และรายงานผลเป็นค่า logCFU/ml เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่มีแบคทีเรียทดสอบ แต่ไม่เติมสารต้านจุลชีพ

7.2 อุณหภูมิ

เติมน้ำมันหอมระเหยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MBC ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6 จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 18 ชั่วโมง ลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยให้มีปริมาณของเชื้อสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 5×10^3 CFU/ml นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 4, 10, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการเจริญของ แบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

วัดค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาปริมาณฮิสทามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของแบคทีเรีย และมีการเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงกว่า 5.7 ด้วยวิธี colorimetric method รวมถึงนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total viable count; TVC) โดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและรายงานผลเป็นค่า logCFU/ml เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่มีแบคทีเรียทดสอบแต่ไม่เติมสารต้านจุลชีพ

7.3 ปริมาณเกลือ

เติมน้ำมันหอมระเหยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่มีเกลือ sodium chloride ผสมอยู่ 0, 0.5, 1, 3, 10 และ 20% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จนมีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับค่า MBC ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6 ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 18 ชั่วโมงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยให้มีปริมาณของเชื้อสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 5×10^3 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการเจริญของแบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วัดค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาปริมาณฮิสทามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของแบคทีเรีย และมีการเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงกว่า 5.7 ด้วยวิธี colorimetric method และนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total viable count; TVC) โดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและรายงานผลเป็นค่า logCFU/ml เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่มีแบคทีเรียทดสอบแต่ไม่เติมสารต้านจุลชีพ

7.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร

เติมน้ำมันหอมระเหยที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -20, 0, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน, 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MBC ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6 ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 18 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยให้มีปริมาณของเชื้อสุดท้ายอยู่ที่ประมาณ 5×10^3 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการเจริญของแบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วัดค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาปริมาณฮิสทามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของแบคทีเรีย และมีการเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้สูงกว่า 5.7 ด้วยวิธี colorimetric method และนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total viable count; TVC) โดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและรายงานผลเป็นค่า logCFU/ml เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่มีแบคทีเรียทดสอบแต่ไม่เติมสารต้านจุลชีพ

8. การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการลดปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในแบบจำลอง ตัวอย่างอาหาร

8.1 ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

เชื้อจางเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 หรือ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมง ด้วยสารละลาย normal saline ที่ปลอดเชื้อ ให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^4 CFU/ml ปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 และ 0.1 มิลลิลิตร สำหรับวิธี pour plate และ spread plate ตามลำดับ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ PCA, TSA และ mNM นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมานับจำนวน โคโลนีทั้งหมด (total viable count; TVC) ในอาหาร PCA และ TSA และนับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน (histamine forming bacteria; HFB) ในอาหาร mNM คำนวณและรายงานผลเป็น logCFU/ml

8.2 ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทูสด

จุ่มปลาทูสดทั้งตัวที่มีขนาดประมาณ 17 ตัวต่อกิโลกรัม ลงในสารละลาย normal saline ที่ฆ่าเชื้อแล้ว และมีเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 หรือ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมง ผสมอยู่ในปริมาณ 10^4 และ 10^7 CFU/ml ในอัตราส่วนของปลาต่อสารละลายของเชื้อเท่ากับ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างปลาทูสดที่ได้มาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PCA และ mNM ตามลำดับ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน คำนวณและรายงานผลเป็น logCFU/g

8.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนในปลาทูด

จุ่มปลาทูดทั้งตัวที่มีขนาดประมาณ 17 ตัวต่อกิโลกรัม ซึ่งสร้างการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *M. morganii* ATCC 25830 หรือ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ตามข้อ 8.2 ลงในสารละลายของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (โดยละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในน้ำกลั่นและปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer) ในอัตราส่วนของปลาต่อสารละลายน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที นำไปฝังให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีน ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PCA และ mNM ตามลำดับ บ่มจนเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีน คำนวณและรายงานผลเป็น logCFU/g

8.4 ทดสอบความแตกต่างทางด้านประสาทสัมผัสของปลาทูดที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปลาทูดที่ผ่านและไม่ผ่านการจุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ โดยนำปลาทูดทั้งตัวที่มีขนาดประมาณ 17 ตัวต่อกิโลกรัม จุ่มในน้ำกลั่น (ตัวอย่างควบคุม) หรือสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (โดยละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในน้ำกลั่นและปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer) ในอัตราส่วนปลาต่อสารละลายน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที ฝังให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสตัวอย่างปลาทูดและปลาหนึ่ง โดยการดมกลิ่นของตะไคร้ เปรียบเทียบกับปลาทูดทั้งตัวหรือหนึ่งแล้วซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยให้ผู้ทดสอบจำนวน 9 คน ดมกลิ่นปลาทูดหรือปลาหนึ่งที่ไม่ผ่านการจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยก่อน (ตัวอย่างควบคุม) เพื่อจดจำลักษณะกลิ่นดั้งเดิมของปลาทูด หลังจากนั้น สุ่มตัวอย่างปลาที่ผ่านการจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการทดสอบ โดยให้คะแนน 0-5 โดย 0 คือตัวอย่างปลาทูดหรือปลาหนึ่งที่ไม่กลิ่นตะไคร้เช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุม และ 5 คือ ตัวอย่างปลาทูดหรือปลาหนึ่งที่มีกลิ่นตะไคร้เข้มข้นมากที่สุด

วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomize complete block design; RCBD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

8.5 ศึกษาผลของการใช้สารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนในปลาทูสด

นำปลาทูสดทั้งตัวที่มีขนาดประมาณ 17 ตัวต่อกิโลกรัม มาสร้างการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 หรือ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 โดยการจุ่มปลาลงในสารละลาย normal saline ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ชุดควบคุม) หรือสารละลายที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ประมาณ 10^7 CFU/ml โดยให้อัตราส่วนปลาต่อสารละลายเชื้อเท่ากับ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาผึ่งไว้บนตะแกรงที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจุ่มปลาที่เตรียมได้ลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.624% ต่อน้ำหนักปลา 1 กรัม (โดยละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในน้ำกลั่นและปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer) เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาผึ่งไว้บนตะแกรงที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วบรรจุลงในถุงซิปลาสติกโพลีเอทิลีนขนาด 5x7 นิ้ว 1 ตัวต่อ 1 ถุง นำตัวอย่างที่ได้มาแบ่งทำการทดลองเป็น 18 สภาวะคือ

8.5.1 ปลาทูสดทั้งตัวที่ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียทดสอบ ที่มีการจุ่มหรือไม่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหย โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)

8.5.2 ปลาทูสดทั้งตัวที่ปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830 ที่มีการจุ่มหรือไม่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหย โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)

8.5.3 ปลาทูสดทั้งตัวที่ปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่มีการจุ่มหรือไม่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหย โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)

โดยทำการเก็บตัวอย่างปลาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้

- อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเป็นเวลา 15 วัน และสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15

- อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เก็บเป็นเวลา 7 วัน และสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7

- อุณหภูมิห้อง เก็บเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24

นำตัวอย่างที่สุ่มได้มาตรวจสอบลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยพิจารณาจากคุณลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ผิวหนัง ตา เหงือก และลักษณะเนื้อสัมผัสของปลาทูด แล้วให้ระดับการไม่ยอมรับ เป็นคะแนน 1-4 ตามคำอธิบายในตารางผนวกที่ ค1 โดยตัวอย่างปลาทูดที่มีระดับการไม่ยอมรับเท่ากับ 1 คือตัวอย่างปลาที่มีความสดมากที่สุด ตัวอย่างปลาทูดที่มีระดับการไม่ยอมรับเท่ากับ 2 คือตัวอย่างปลาที่ค่อนข้างสด ตัวอย่างปลาทูดที่มีระดับการไม่ยอมรับเท่ากับ 3 คือตัวอย่างปลาที่มีความสดน้อย และตัวอย่างปลาทูดที่มีระดับการไม่ยอมรับเท่ากับ 4 คือตัวอย่างปลาที่เน่าแล้ว

รวมทั้งวัดค่าความเป็นกรดต่างที่เปลี่ยนแปลงไป ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอิตามิน โดยการ spread plate บนอาหาร PCA และ mNM ตามลำดับ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมานับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร PCA ที่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี และนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างอิตามินที่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 10-50 โคโลนียบนอาหาร mNM รายงานผลเป็น logCFU/g

9. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) และ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

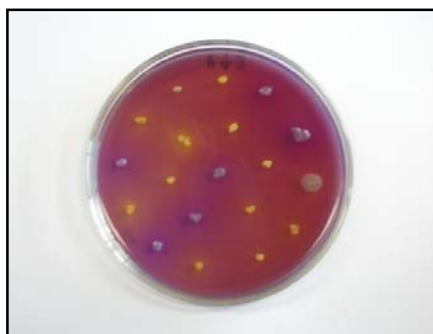
10. สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย

อาคาร โรงงานต้นแบบแปรรูปสัตวันน้ำ ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และทำการวิจัยตั้งแต่เดือนเมษายน 2549 ถึง เดือนเมษายน 2552

ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอิซทามีนจากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์

จากการนำเนื้อปลากลุ่มสคอมบรอยด์ทั้ง 3 ชนิด คือ ปลาหู (R. brachysoma) ปลาโอลาย (E. affinis) และปลาอินทรี (S. commerson) มาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี spread plate บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA พบว่าปลาทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง 3.04-5.28 logCFU/g โดยพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดในเนื้อปลาหู และจากการสุ่มเก็บโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาทดสอบการสร้างอิซทามีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mNM พบว่ามีแบคทีเรียที่สร้างอิซทามีนได้รวมทั้งสิ้น 166 ไอโซเลต หรือคิดเป็น 19.30% ของจำนวนไอโซเลตที่สุ่มมาทดสอบทั้งหมด 860 ไอโซเลต โดยคัดแยกได้จากตัวอย่างปลาหู 73 ไอโซเลต จากตัวอย่างปลาอินทรี 50 ไอโซเลต และจากตัวอย่างปลาโอลาย 43 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 7) พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ จะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ดังนั้นสีของโคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนจากสีม่วงอมแดงเป็นสีเหลืองเนื่องจากกรดที่เกิดขึ้น แต่ถ้าแบคทีเรียใดสามารถสร้างสารอิซทามีนได้จากสารฮิสทีดีนสังเคราะห์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น สีของโคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนกลับมาเป็นสีม่วง เนื่องจากด่างที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างสารอิซทามีน (โคโลนีสีฟ้าอมม่วง โชนล้อมรอบสีม่วง) และไม่สร้างสารอิซทามีน (โคโลนีสีเหลือง โชนล้อมรอบสีเหลือง) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Niven's medium

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในเนื้อปลาหู ปลาอินทรี ปลาโอลาย และจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนเมื่อคัดแยกด้วยอาหาร modified Niven's medium

ปลา	การเก็บตัวอย่างครั้งที่	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)	จำนวนไอโซเลตที่สุ่มมาทดสอบ	จำนวนไอโซเลตที่สร้างฮิสทามีน
หู	1	5.15	104	24
	2	4.48	95	12
	3	5.28	133	37
อินทรี	1	3.84	47	9
	2	4.11	78	23
	3	3.04	70	18
โอลาย	1	4.81	105	7
	2	4.88	95	17
	3	4.89	133	19
		รวม	860	166

จากการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนซึ่งคัดแยกได้ทั้ง 166 ไอโซเลต โดยอาศัยคุณสมบัติในการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตะเลส ทำให้สามารถจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียดังกล่าวออกได้เป็น 9 กลุ่ม (ตารางที่ 8) โดยจากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสทามีน ส่วนใหญ่จะอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ปลายมน ติดสีแกรมลบ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส (นริกุล และ อรษา, 2532; ดวงพร, 2537) แต่จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 166 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรูปร่างท่อนสั้นเกือบกลม สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลส โดยสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากปลาหู จำนวน 57 ไอโซเลต ปลาอินทรี จำนวน 48 ไอโซเลต และปลาโอลาย จำนวน 37 ไอโซเลต รวมทั้งสิ้น 142 ไอโซเลต

ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 นี้มีลักษณะที่ไม่สอดคล้องกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae แต่พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 8 รวมจำนวน 4 ไอโซเลต มีลักษณะที่สอดคล้องกับแบคทีเรียในวงศ์ดังกล่าว โดยคัดเลือกได้จากปลาหูจำนวน 3 ไอโซเลต และจากปลาโอลาย 1 ไอโซเลต

ตารางที่ 8 สันฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้จากปลาหู ปลาอินทรี และปลาโอลาย

กลุ่มที่	การคิดสี่ แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัวของเซลล์	การสร้างเอนไซม์		จำนวนไอโซเลต		
				ออกซิเดส	คะตะเลส	ปลาหู	ปลาอินทรี	ปลาโอลาย
1	ลบ	ท่อนสั้นเกือบกลม	อยู่เป็นคู่	+ve	+ve	57	48	37
2	ลบ	ท่อน ปลายแหลม	เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว	+ve	+ve	4	0	0
3	ลบ	ท่อน	เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว	-ve	+ve	2	0	1
4	ลบ	ท่อน	เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว	+ve	+ve	4	0	0
5	ลบ	ท่อน	เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว	+ve	-ve	1	0	0
6	ลบ	ท่อน	เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว	-ve	-ve	2	2	5
7	ลบ	ท่อนสั้นเกือบกลม	เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว	-ve	-ve	1	0	0
8	ลบ	ท่อนสั้นเกือบกลม	อยู่เป็นคู่	-ve	+ve	1	0	0
9	ลบ	ท่อน	ต่อกันเป็นสาย	+ve	+ve	1	0	0

หมายเหตุ +ve = สร้างเอนไซม์, -ve = ไม่สร้างเอนไซม์

จากการทดสอบการสร้างอิฐทามีนในขั้นต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยการวัดค่าความเป็นกรดต่างที่เพิ่มขึ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งของอิฐทาดินจากธรรมชาติ (FJ) และสารอิฐทาดินสังเคราะห์ (HEB) มักพบว่าแบคทีเรียที่สร้างสารอิฐทามีนได้ จะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น (pH 5.7) ซึ่งจะทำให้สีของ bromocresol purple ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงอมแดงเป็นสีม่วงเข้ม เมื่อพิจารณาผลของการสร้างอิฐทามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยใช้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากกว่า 6.10 เป็นเกณฑ์ ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างดังกล่าว เป็นค่าความเป็นกรดต่างต่ำสุด ที่ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างอิฐทามีนซึ่งเป็นตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม โดยที่สายพันธุ์แบคทีเรียที่เกิดผลบวกนั้นมีจำนวนไม่มากเกินไป จากผลการทดลองที่ได้ในการทดลองนี้ พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 2 ไอโซเลต (RK60 และ RK64) ที่สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างได้ค่ามากกว่า 6.10 ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HEB และมีแบคทีเรียที่สร้างอิฐทามีนจำนวน 43 ไอโซเลตที่สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ค่ามากกว่า 6.10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ หรือ HEB อย่างใดอย่างหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 9

จากรายงานผลการวิจัยในอดีต พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Niven's medium (Niven *et al.*, 1981) และอาหาร modified Niven's medium (mNM) เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างอิฐทามีนมักให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอิฐทามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีทางเคมี (Kim *et al.*, 2001; Rodtong *et al.*, 2005) ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ถูกต้อง จึงทำการทดสอบการสร้างอิฐทามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อีกครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HEB ในขั้นตอนต่อไป

ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ พบว่าแบคทีเรียที่สร้างอิฐทามีนสายพันธุ์ RK69, RK60 และ RK65 สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร HEB ได้มากที่สุด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น กลับพบว่าแบคทีเรียดังกล่าว ไม่สามารถสร้างอิฐทามีนได้ เมื่อพิจารณาจากค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร HEB ที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นเล็กน้อย จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ หรือ HEB ได้มากกว่า 6.10 จำนวน 9 สายพันธุ์คือ แบคทีเรียที่สร้างอิฐทามีนสายพันธุ์ RK11, RK20, RK24, RK32, RK37, RK61, RK64, EA6 และ EA21 ซึ่งแต่ละสายพันธุ์เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่สร้างอิฐทามีนจากกลุ่มต่าง ๆ ในตารางที่ 8 มาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป โดยในจำนวนแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมานี้ มีแบคทีเรียที่สร้างอิฐทามีนสายพันธุ์ RK64 ที่สามารถเพิ่มค่าความ

เป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ HEB ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ
แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ตารางที่ 9 สายพันธุ์แบคทีเรียซึ่งคัดเลือกได้จากปลากลุ่มสคอมบรอยด์ที่สามารถเพิ่มความเป็นกรด
ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ หรือ HEB ได้ค่ามากกว่า 6.10

สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรดต่าง		สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรดต่าง	
	FJ	HEB		FJ	HEB
RK6	6.12±0.01 ^{kl}	5.75±0.02 ^{DEFGH}	EA6	6.43±0.02 ^a	5.80±0.03 ^{DE}
RK11	6.12±0.02 ^{kl}	5.81±0.02 ^D	EA7	6.12±0.02 ^{kl}	5.84±0.01 ^D
RK14	6.11±0.01 ^l	5.63±0.00 ^H	EA8	6.13±0.01 ^{kl}	5.83±0.01 ^D
RK17	6.25±0.01 ^{cde}	5.65±0.01 ^{FGH}	EA10	6.16±0.01 ^{hijkl}	5.74±0.04 ^{DEFGH}
RK18	6.12±0.01 ^{kl}	5.64±0.01 ^{GH}	EA11	6.13±0.01 ^{kl}	5.84±0.00 ^D
RK20	6.39±0.01 ^{ab}	5.78±0.02 ^{DEFG}	EA13	6.27±0.03 ^{defg}	5.82±0.01 ^D
RK23	6.15±0.03 ^{ijkl}	5.72±0.01 ^{DEFGH}	EA14	6.26±0.02 ^{cd}	5.80±0.03 ^D
RK24	6.37±0.00 ^b	5.77±0.06 ^{DEFGH}	EA15	6.16±0.01 ^{hijkl}	5.78±0.02 ^{DEFG}
RK25	6.22±0.02 ^{defg}	5.78±0.01 ^{DEFG}	EA17	6.27±0.02 ^{cd}	5.82±0.01 ^D
RK32	6.20±0.02 ^{efghi}	5.73±0.01 ^{DEFGH}	EA18	6.11±0.04 ^l	5.82±0.01 ^D
RK36	6.14±0.01 ^{ijkl}	5.70±0.01 ^{DEFGH}	EA20	6.21±0.03 ^{efgh}	5.82±0.01 ^D
RK37	6.13±0.03 ^{kl}	5.70±0.01 ^{DEFGH}	EA21	6.16±0.02 ^{hijkl}	5.83±0.01 ^D
RK41	6.21±0.01 ^{efgh}	5.66±0.03 ^{EFGH}	EA22	6.12±0.07 ^{kl}	5.83±0.02 ^D
RK60	6.13±0.01 ^{kl}	6.52±0.01 ^B	EA24	6.12±0.02 ^{kl}	5.83±0.01 ^D
RK61	6.04±0.00 ^m	6.19±0.24 ^C	EA25	6.14±0.01 ^{ikl}	5.82±0.01 ^D
RK64	6.17±0.03 ^{ghijk}	6.22±0.30 ^C	EA29	6.14±0.06 ^{ikl}	5.84±0.01 ^D
RK65	5.93±0.00 ⁿ	6.44±0.02 ^B	EA40	6.14±0.02 ^{ikl}	5.77±0.00 ^{DEFGH}
RK66	6.23±0.02 ^{cdef}	5.83±0.01 ^D	EA43	6.11±0.03 ^l	5.78±0.01 ^{DEFG}
RK67	5.92±0.01 ⁿ	6.20±0.26 ^C	SC2	6.17±0.01 ^{ghijk}	5.77±0.01 ^{DEFGH}
RK69	5.96±0.01 ⁿ	6.65±0.02 ^A	SC12	6.19±0.03 ^{efghij}	5.76±0.01 ^{DEFGH}
RK72	6.28±0.08 ^c	5.79±0.02 ^{DEF}	SC16	6.16±0.03 ^{hijkl}	5.72±0.04 ^{DEFGH}
EA2	6.11±0.01 ^l	5.75±0.02 ^{DEFGH}			

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กหรือพิมพ์ใหญ่ต่างกัน มีความแตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2. การตรวจหาปริมาณสารอิสตามีนที่แบคทีเรียซึ่งคัดเลือกได้สร้างขึ้น

จากผลการทดลองเพื่อตรวจหาปริมาณสารอิสตามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE พบว่าปริมาณสารอิสตามีนที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่สร้างอิสตามีนทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *M.morganii* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 รวมทั้งแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนซึ่งคัดแยกได้จากปลาในกลุ่มสกอมบรอยด์ทั้ง 9 สายพันธุ์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric method และ enzymatic analysis method ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 โดยพบว่า *M.morganii* ATCC 25830 และแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนที่คัดแยกได้จากปลากลุ่มสกอมบรอยด์สายพันธุ์ RK64 สามารถสร้างอิสตามีนได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ คือ 999.17 และ 67.56 ppm และในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,368.06 และ 2,669.88 ppm ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี colorimetric method

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารอิสตามีนที่แบคทีเรียที่นำมาทดสอบสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE มีค่าอยู่ระหว่าง 0.04-71.58 ppm เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอิสตามีนด้วยวิธี enzymatic analysis method โดยพบว่าแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนสายพันธุ์ RK11 และสายพันธุ์ RK64 สามารถสร้างอิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ ได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 45.62 และ 37.28 ppm ตามลำดับ และแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงคือ *M.morganii* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 สามารถสร้างอิสตามีนได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 71.58 และ 63.95 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ปริมาณฮิสตามีนซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric method และ enzymatic analysis method

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณฮิสตามีน (ppm)			
	Colorimetric method		Enzymatic analysis method	
	FJ	HE	FJ	HE
ฮิสตามีนอ้างอิง 1,650 ppm ¹	925.49±18.87 ^b	864.72±29.07 ^d	5.18±0.85 ^e	79.65±3.62 ^a
<i>M. morgani</i> ATCC 25830	999.17±22.03 ^a	2,368.06±27.88 ^b	3.51±1.00 ^{ef}	71.58±0.40 ^b
<i>Lactobacillus</i> sp. สายพันธุ์ H15	7.81±4.79 ^f	290.28±5.06 ^c	0.44±0.39 ^f	63.95±0.66 ^c
RK11	26.82±3.08 ^c	3.40±0.60 ^f	45.62±5.85 ^a	8.16±1.10 ^d
RK20	66.21±8.15 ^c	3.40±0.58 ^f	1.67±1.79 ^{ef}	5.26±0.30 ^{ef}
RK24	46.51±1.60 ^d	7.47±3.25 ^f	9.04±1.19 ^d	6.32±1.00 ^{de}
RK32	16.64±3.12 ^{ef}	3.06±1.01 ^f	2.37±1.89 ^{ef}	3.42±0.40 ^f
RK37	46.85±3.50 ^d	3.06±1.02 ^f	2.46±0.80 ^{ef}	5.09±0.55 ^{ef}
RK61	67.22±3.89 ^c	1,025.99±5.21 ^c	27.46±2.84 ^c	0.97±0.94 ^g
RK64	67.56±1.31 ^c	2,669.88±20.60 ^a	37.28±0.66 ^b	0.04±0.03 ^g
EA6	17.32±2.63 ^{ef}	8.15±2.40 ^f	28.34±1.10 ^c	0.53±0.39 ^g
EA21	68.24±3.65 ^c	10.87±2.09 ^f	34.74±0.70 ^b	5.17±0.26 ^{ef}

หมายเหตุ ¹ อาหารเลี้ยงเชื้อ FJ หรือ HE ที่เติมสารละลายฮิสตามีนความเข้มข้น 1,650 ppm, ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตามหลักการของวิธี colorimetric method (Patange *et al.*, 2005) ในการตรวจหาปริมาณสารฮิสตามีนสามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดสารฮิสตามีนด้วย 2.5% trichloroacetic acid (2) กำจัดส่วนประกอบที่ไม่ใช่ฮิสตามีนออกด้วยวิธี ion exchange column โดยใช้ weakly acidic cation exchange resin (Amberlite-CG50) และ (3) การ derivatisation ตัวอย่างที่ได้ด้วยสาร diazo reagent แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร

ส่วนกลไกการตรวจวัดปริมาณฮิสตามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ หรือ HE ด้วยวิธี enzymatic analysis method (Sumner and Taylor, 1989) พบว่าสารฮิสตามีนจะทำปฏิกิริยา

oxidation กับเอนไซม์ diamine oxidase เกิดเป็นสาร imidazole acetaldehyde, ammonia และ hydrogen peroxide โดยที่ hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้นนี้จะสามารถตรวจวัดได้ โดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ horse radish peroxidase แล้วเกิดเป็นสาร crystal violet อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารฮิสตามีนมาก จะเกิดสีม่วง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารฮิสตามีนเล็กน้อยหรือไม่มีเลย จะไม่ทำให้เกิดสีของ crystal violet

โดยภาพรวมแล้วปริมาณสารฮิสตามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่วิเคราะห์ด้วยวิธี enzymatic analysis method มีค่าน้อยกว่าปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากวิธี colorimetric method เมื่อพิจารณาจาก % recovery ที่ได้จากการเติมสารละลายฮิสตามีนความเข้มข้น 1,650 ppm ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่า % recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี enzymatic analysis method มีค่าต่ำมาก คือ 0.31 และ 4.83% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE ตามลำดับ ในขณะที่วิธี colorimetric method ให้ค่า % recovery สูงกว่า คือ 56.09 และ 52.41% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปของอาหาร FJ หรือ HEB (ตารางที่ 9) กับปริมาณสารฮิสตามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (ตารางที่ 10) พบว่าปริมาณสารฮิสตามีนที่วิเคราะห์ได้จากวิธี colorimetric method มีความสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ กล่าวคือแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร FJ ได้มากกว่า HEB ก็พบว่าปริมาณสารฮิสตามีนในอาหาร FJ มากกว่า HE เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร HEB ได้มากกว่า FJ ก็พบว่าปริมาณสารฮิสตามีนในอาหาร HE มากกว่า FJ เช่นเดียวกัน ตรงกันข้ามกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฮิสตามีนด้วยวิธี enzymatic analysis method ซึ่งพบว่าปริมาณสารฮิสตามีนไม่มีความสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปในอาหาร FJ หรือ HEB ในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

ถึงแม้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนที่ใช้ในการทดลองนี้จะมีความแม่นยำต่ำ เมื่อพิจารณาจาก % recovery ที่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี enzymatic analysis method นั้น ทำการวิเคราะห์สารฮิสตามีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง โดยไม่ได้มีการกำจัดสารอื่นที่อาจไปรบกวนการเกิดปฏิกิริยาออกไปดังเช่นวิธี colorimetric method (Sumner and Taylor, 1989) จึงทำให้ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric method มาก หรืออาจเกิดจากปริมาณสารฮิสตามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ไม่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของสารที่วิธีการดังกล่าวจะสามารถตรวจวัดได้ (detection limit) จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้นั้น ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองจากวิธีการอื่น อย่างไรก็ตามปริมาณสารฮิสตามีนที่วิเคราะห์ได้ก็สามารถนำมาใช้

เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างฮิสทามีนของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดได้อย่างคร่าว ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ผลจากการวิเคราะห์หาปริมาณฮิสทามีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นด้วยวิธี colorimetric method มาเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่จะนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป โดยจากผลในตารางที่ 10 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RK64 เป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อนำไปทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากสามารถสร้างฮิสทามีนได้ในปริมาณสูงสุด รวมถึงยังได้คัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนอีกจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนสายพันธุ์ RK24, RK32, และ RK37 มาเป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ RK64 ซึ่งคัดแยกได้จากปลากลุ่มสกอมบรอยด์ที่สามารถสร้างฮิสทามีนได้สูงสุด มาศึกษาหาลำดับเบสของ 16s rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16s rDNA ของแบคทีเรียอ้างอิงชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RK64 มีลำดับเบสของ 16s rDNA สอดคล้องกับลำดับเบสของ 16s rDNA ของ *Psychrobacter* sp. (98 % identify) โดยลำดับเบสเปรียบเทียบของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 4 ดังนั้นจึงจัดจำแนกและกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

```

Query 1          CTTGCTATCAGGCGTCGAGCGGAGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCAGTAGT 60
|||||
Sbjct 2808748  CTTGCTATCAGGCGTCGAGCGGAGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCAGTAGT 2808689

Query 61         GGGGGATAGCTCGGGGAAACTCGTATTAATACCGCATAACCCCTACGGGGAAAAGGGGGC 120
|||||
Sbjct 2808688  GGGGGATAGCTCGGGGAAACTCGAATTAATACCGCATAACCCCTACGGGGAAAAGGGGGC 2808629

Query 121        GCTTGCCTCTCGCTATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTATCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC 180
|||||
Sbjct 2808628  GCTTGCCTCTCGCTATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC 2808569

Query 181        CTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGAACTGAGA 240
|||||
Sbjct 2808568  CTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGA 2808509

Query 241        CACGGTCCGGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCT 300
|||||
Sbjct 2808508  CACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCT 2808449

Query 301        GATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAGCACTTTAATCAGTG 360
|||||
Sbjct 2808448  GATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGTG 2808389

Query 361        AACAAAGACTCTATGGTTAATACCCATAGACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCGGC 420
|||||
Sbjct 2808388  AAGAAGACTCTATGGTTAATACCCATAGACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCGGC 2808329

Query 421        TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG 442
|||||
Sbjct 2808328  TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG 2808307

```

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลำดับเบสบน 16s rDNA ของสายพันธุ์ RK64 (เส้นบน) และ *Psychrobacter* sp. PRwf-1 (เส้นล่าง)

Psychrobacter sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้นเกือบกลม (cocci bacilli) ไม่เคลื่อนที่ มักพบการจัดเรียงตัวเป็นคู่ สี่เหลี่ยม ไชม์ออกซิเดสและคะตะเลส จัดอยู่ในวงศ์ Moraxellaceae ลำดับ Pseudomonadales พบอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หนาวเย็น เช่น น้ำแข็ง ดิน และตะกอน รวมทั้งในทะเลลึก นอกจากนี้ยังพบได้ในแหล่งอาหารหลายชนิด เช่น ปลา ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมทั้งในสายการผลิตของอาหารเหล่านี้ (Gennari *et al.*, 1999; Bagge-Ravn *et al.*, 2003; Jay *et al.*, 2003; Ringo *et al.*, 2006) รวมทั้ง *Psychrobacter* ยังเป็นแบคทีเรียชนิดหลักที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบได้ตามผิวหนังของปลา (Sikorski *et al.*, 1990) ซึ่งจากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณ วิตามินที่แบคทีเรียสร้างขึ้น จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียชนิดดังกล่าว อาจก่อให้เกิดอันตรายจากสาร วิตามินได้ เนื่องจากสามารถสร้างวิตามินในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ แบคทีเรียที่ทำการทดสอบทั้งหมด คือสร้างวิตามินได้ 2,669.88 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE และ ยังจัดอยู่ในแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดเลือกได้จากปลากลุ่มสคอมบรอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้

มีงานวิจัยในอดีตที่พบว่า *Psychrobacter* sp. และ *Psychrobacter cibarius* ซึ่งคัดแยกได้จากปลาแมกเคอเรลเค็ม สามารถสร้างอิซิทามีนได้ปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่คัดแยกได้ (Hwang and Kim, 2005; Kim and Kim, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลการคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถสร้างอิซิทามีนจากปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทูน่าอัลบาคอร์ ปลากระโทงร่ม ปลาโอลาย ปลาอินทรี และปลาโบนิโต (Ben-Gigirey *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2004; Korashy and Farag, 2005) ซึ่งพบแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *M. morgani*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. mirabilis*, *Rahnella agnatis* และ *C. braakii* โดยพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างอิซิทามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ระหว่าง 20-2,003 ppm และมีบางสายพันธุ์ที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Moraxcellaceae เช่น *A. baumannii* และวงศ์ Pseudomonadaceae เช่น *Pseudomonas putida* ซึ่งพบว่าสามารถสร้างอิซิทามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ระหว่าง 275-1,234.8 ppm

4. การเตรียมสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

จากการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของสารละลาย DMSO และ ethanol ที่เหมาะสมในการละลายน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุด โดยใช้อัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยต่อสารละลาย DMSO ต่อสารละลาย ethanol เท่ากับ 1:3:3 โดยปริมาตร ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 โดยเมื่อใช้สารละลายผสมของ DMSO (100%) ต่อ ethanol (100%) พบว่าสารผสมดังกล่าวสามารถละลายน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุด แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการละลายรองลงมา คือ DMSO (100%) ต่อ ethanol (75%) ซึ่งพบว่าสามารถละลายน้ำมันหอมระเหยได้ดีใกล้เคียงกัน แต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพในการละลายน้ำมันหอมระเหยและผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของสารละลาย DMSO และ ethanol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

DMSO (%)	Etha-nol (%)	การละลายของน้ำมันหอมระเหย ¹											การยับยั้งแบคทีเรีย ²					
		ชนิดของน้ำมันหอมระเหย ³											ชนิดของแบคทีเรีย ⁴					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M	L	P	24	32	37
100	100	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	+	-	-
100	75	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
100	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
75	75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
75	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
50	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ¹ ++ = ละลายได้ดี, + = ละลายได้ปานกลาง, - = ไม่ละลาย

² + = ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้, - = ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

³ 1 = กระชาย, 2 = กะเพรา, 3 = ขมิ้นชัน, 4 = ข่า, 5 = ตะไคร้, 6 = ใบฝรั่ง, 7 = พริกไทยดำ, 8 = พลู, 9 = ใบมะกรูด, 10 = ผลมะกรูด, 11 = โหระพา

⁴ M = *M. morgani* ATCC 25830, L = *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15, P =

Psychrobacter sp. สายพันธุ์ RK64, 24 = สายพันธุ์ RK24, 32 = สายพันธุ์ RK32, 37 = สายพันธุ์ RK37

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งคัดเลือกได้

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 142.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน ได้แก่ *M. morgani* ATCC 25830, *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 รวมถึงแบคทีเรียที่สร้าง

อิสตามีนสายพันธุ์ RK24, สายพันธุ์ RK32 และสายพันธุ์ RK37 พบว่าแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนสายพันธุ์ RK24 และสายพันธุ์ RK32 มีความไวต่อสารต้านจุลชีพมากที่สุด โดยถูกยับยั้งการเจริญด้วยน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านรวม 12 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกระชาย กะเพรา ตะไคร้ ใบพลู ใบมะกรูดและผลมะกรูด สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง กระจิน บัวบก แมงลัก ขอ และลูกใต้ใบ (ตารางที่ 12)

Psychrobacter sp. สายพันธุ์ RK64 และแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนสายพันธุ์ RK37 มีความไวต่อสารต้านจุลชีพรองลงมา โดยมีสารต้านจุลชีพรวม 11 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกระชาย กะเพรา ตะไคร้ ใบพลู ใบมะกรูด ผลมะกรูด สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง กระจิน บัวบก แมงลัก และลูกใต้ใบ

M. morgani ATCC 25830 มีความไวต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบรวม 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง และสารสกัดจากลูกใต้ใบ ในขณะที่ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 มีความไวต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบน้อยที่สุด โดยมีเพียงน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา สารสกัดจากกระจิน และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้

ตารางที่ 12 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน

สารต้านจุลชีพ	ขนาดของ inhibition zone (มิลลิเมตร)					
	LT	MM	PB	RK24	RK32	RK37
<u>น้ำมันหอมระเหย</u>						
กระชาย	NA	NA	8.8±0.3 ^{deC}	10.3±0.6 ^{deAB}	11.5±0.9 ^{fA}	10.0±0.9 ^{dB}
กะเพรา	11.2±2.3 ^{bd}	12.3±1.0 ^{aCD}	14.7±1.4 ^{bBC}	12.8±0.8 ^{cbCD}	15.2±1.0 ^{dB}	18.5±0.9 ^{bA}
ขมิ้นชัน	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ข่า	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ตะไคร้	NA	11.0±1.0 ^{abE}	24.7±1.5 ^{aC}	14.0±0.9 ^{bd}	29.5±0.9 ^{ab}	33.0±2.6 ^{aA}
ใบฝรั่ง	NA	NA	NA	NA	NA	NA
พริกไทยดำ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ใบพลู	NA	NA	12.5±0.9 ^{cb}	19.2±0.8 ^{aA}	12.7±0.8 ^{cb}	13.7±3.2 ^{cb}
ใบมะกรูด	NA	NA	11.5±1.3 ^{cbC}	9.3±0.8 ^{cC}	14.0±0.5 ^{deB}	18.7±3.1 ^{bA}
ผลมะกรูด	NA	NA	9.5±0.5 ^d	10.7±0.6 ^d	11.0±1.3 ^f	11.2±0.6 ^{cd}
โหระพา	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<u>สารสกัดจากพืชพื้นบ้าน</u>						
กระเจี๊ยบแดง	7.7±0.6 ^{cC}	10.0±0.0 ^{bb}	11.2±0.8 ^{aA}	11.3±0.6 ^{dA}	11.3±0.8 ^{fA}	12.0±0.5 ^{cdA}
เหง้ากระชาย	NA	NA	NA	NA	NA	NA
รากกระชาย	NA	NA	NA	NA	NA	NA
กระถิน	17.3±0.6 ^{ab}	NA	12.5±0.5 ^{cC}	19.0±0.0 ^{aAB}	20.7±2.1 ^{bA}	9.3±0.3 ^{dB}
กระเทียม	NA	NA	NA	NA	NA	NA
กล้วย	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ข่า	NA	NA	NA	NA	NA	NA
แค	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ชะพลู	NA	NA	NA	NA	NA	NA
บัวบก	NA	NA	8.7±0.3 ^{deB}	8.2±0.8 ^{dB}	7.7±0.3 ^{dB}	10.3±1.0 ^{dA}

ตารางที่ 12(ต่อ)

สารต้านจุลชีพ	ขนาดของ inhibition zone (มิลลิเมตร)					
	LT	MM	PB	RK24	RK32	RK37
<u>สารสกัดจากพืชพื้นบ้าน</u>						
ผักโหม	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ฟ้าทะลายโจร	NA	NA	NA	NA	NA	NA
แมงลัก	NA	NA	7.7±0.3 ^c	7.7±0.6 ^f	7.3±0.3 ^e	9.0±1.3 ^d
ขมิ้น	NA	NA	NA	7.5±0.5 ^f	7.5±0.5 ^e	NA
ลูกใต้ใบ	NA	9.8±0.3 ^{bb}	15.5±1.3 ^{ba}	14.3±0.6 ^{ba}	18.0±1.0 ^{ca}	13.8±1.9 ^{ca}

หมายเหตุ LT = *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15, MM = *M. morgani* ATCC 25830, PB = *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, NA = ไม่เกิดผลการยับยั้ง, ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกัน ในแนวตั้งหรือพิมพ์ใหญ่ต่างกัน ในแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

โดยจากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่ได้จากพืชนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ใช้ทดสอบ ส่วนของพืชที่ใช้ วิธีการสกัด ความเข้มข้น และ ปริมาณที่ใช้แล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบอีกด้วย (Barbosa-Canovas, 1998)

จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราและสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้หลากหลายชนิดมากที่สุด โดยให้ผลในการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดของ inhibition zone อยู่ระหว่าง 11.2-18.5 และ 7.7-12.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ สารสกัดจากกระถิน และสารสกัดจากลูกใต้ใบ ซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยขนาด inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีค่าอยู่ระหว่าง 11.0-

33.0 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดจากกระถินและลูกใต้ใบ มีค่าอยู่ระหว่าง 9.3-19.0 และ 9.8-18.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

น้ำมันหอมระเหยจากกระชาย ใบพลู ใบมะกรูด ผลมะกรูด สารสกัดจากบัวบก และแมงลัก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, แบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24, สายพันธุ์ RK32 และสายพันธุ์ RK37 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. morganii* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 ได้ โดยมีขนาด inhibition zone ของสารต้านจุลชีพทั้ง 6 ชนิดอยู่ระหว่าง 7.3-19.2 มิลลิเมตร

สารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้เล็กน้อยคือ สารสกัดจากใบอบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24 และสายพันธุ์ RK32 โดยมีขนาดของ inhibition zone เท่ากับ 7.5 มิลลิเมตร ส่วนสารต้านจุลชีพที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบชนิดใดได้เลยคือ น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน ข่า ใบฝรั่ง พริกไทยดำ และสารสกัดจากเหง้าและรากกระชาย กระเทียม กล้วย ข่า แคน ชะพลู ผักโหม และฟ้าทะลายโจร

สารต้านจุลชีพที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ นอกจากจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งนำมาทดสอบแล้ว ยังพบว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และ Vibrionaceae ได้อีก เช่น *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulgaris* รวมทั้ง *L. plantarum* และ *L. cellobiosus* ได้อีกด้วย (วาทีณี, 2546; ปทุม และคณะ, 2550; Cimanga *et al.*, 2002; Dabur *et al.*, 2007; Tolulope, 2007; Wei *et al.*, 2008)

น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน ข่า ใบฝรั่ง พริกไทยดำ และสารสกัดจากเหง้าและรากกระชาย กระเทียม กล้วย ข่า แคน ชะพลู ผักโหม และฟ้าทะลายโจร แม้จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในการทดลองนี้ได้ แต่มีงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดด้วย methanol, ethanol, น้ำ และน้ำมันหอมระเหยของพืชเหล่านี้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae, Vibrionaceae และ *Lactobacillus* spp. (วาทีณี, 2546; Srinivasan *et al.*, 2001; Voravuthikunchai *et al.*, 2004; Pattaratanawadee *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2006) โดยเฉพาะสารสกัดด้วย ethanol จากพืช *Zuccagnia punctata* น้ำมันหอมระเหยจากใบของ *Calycotome villosa* และสารสกัดด้วย benzene จากมะม่วงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *M. morganii* ได้ (Singh and Nath, 1998; Loy *et al.*, 2001; Zampini *et al.*, 2005)

นอกจากชนิดของพืชที่ใช้ จะมีความสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแล้ว วิธีการสกัดก็มีความสำคัญต่อผลการทดสอบเช่นกัน ดังเช่นผลการทดลองของ Thongsong (2005) ที่พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกระชายมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และฆ่าทำลาย (MBC) เชื้อ *S. Typhimurium* และ *L. monocytogenes* ต่ำกว่าสารสกัดด้วย ethanol ของพืชดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมและใบมะกรูด ก็มีค่า MIC ต่อ *Salmonella* spp., *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* ต่ำกว่าสารสกัดด้วย ethanol ของพืชทั้ง 2 ชนิด (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005) จากการทดลองนี้ แม้จะไม่ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดด้วย ethanol จากกระเทียม เปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยของพืชดังกล่าว แต่ก็พบว่าสารสกัดดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนทั้ง 6 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากกระชายที่ได้จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดด้วย ethanol ของพืชดังกล่าว ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าว มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้จากปลากลุ่มสคอมบรอยด์ทั้ง 4 สายพันธุ์

การที่น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ methanol หรือ ethanol นั้น เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีสารออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียมากกว่านั่นเอง (Kosalec *et al.*, 2005; Nanasombat and Lohasupthawee, 2005)

โครงสร้างของจุลินทรีย์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่มีความสำคัญต่อความสามารถในการต้านทานต่อสารต้านจุลชีพ ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แข็งแรงและซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม มี peptidoglycan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แต่แบคทีเรียแกรมลบจะมีส่วนผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) อีกชั้นหนึ่ง จึงทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อถูกสารต้านจุลชีพทำลายผนังเซลล์แล้ว ก็ยังเหลือผนังเซลล์ชั้นนอกอีกชั้นหนึ่ง สอดคล้องกับผลการทดลองของประทุม และคณะ (2550) และ Suppakul *et al.* (2006) ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม ใบมะกรูด พริกไทยดำ โหระพา และใบพลู มีค่า MIC ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. Typhimurium* สูงกว่าค่า MIC ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. cereus*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยแล้ว สารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ของ

แค ขมิ้นชัน และลูกใต้ใบ ก็ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกัน (Srinivasan *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Kloucek *et al.*, 2005)

จากการทดสอบหาค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพ (activity unit) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรามีค่า activity unit สูงสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 800-12,800 AU/ml โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK37 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24, สายพันธุ์ RK32, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, *M. morganii* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 ตามลำดับ ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 13

รองลงมาคือสารสกัดจากลูกใต้ใบ ซึ่งมีค่า activity unit อยู่ระหว่าง 200-6,400 AU/ml โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK32 และสายพันธุ์ RK37 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 แบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24 และ *M. morganii* ATCC 25830 ตามลำดับ

น้ำมันหอมระเหยจากกระชาย ตะไคร้ และใบพลูมีค่า activity unit ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 800-3,200, 1,600-3,200 และ 1,600-3,200 AU/ml ตามลำดับ แต่น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้หลากหลายสายพันธุ์กว่าน้ำมันหอมระเหยอีก 2 ชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ถึง 5 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ RK37 ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24, สายพันธุ์ RK32, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และ *M. morganii* ATCC 25830 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเฉพาะสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง มีค่า activity unit รองลงมาจากสารสกัดจากลูกใต้ใบ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 100-1,600 AU/ml ซึ่งแม้ว่าจะมีค่าต่ำกว่าค่า activity unit ของสารสกัดจากลูกใต้ใบ แต่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้หลากหลายสายพันธุ์กว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24 และ สายพันธุ์ RK37 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK32, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, *M. morganii* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้ ทำให้สามารถคัดเลือกชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่มีค่า activity unit สูงสุด กลุ่มละ 2 ชนิด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไปคือน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ สารสกัดจากลูกใต้ใบ และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

ตารางที่ 13 ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพและความเข้มข้นที่ใช้ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

สารต้านจุลชีพ	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพ (AU/ml)					
	LT	MM	PB	RK24	RK32	RK37
<u>น้ำมันหอมระเหย</u>						
กระชาย	ND	ND	800(35.71) ¹	3,200(8.93)	3,200(8.93)	3,200(8.93)
กะเพรา	800(35.71)	3,200(8.93)	6,400(4.46)	6,400(4.46)	6,400(4.46)	12,800(2.23)
ตะไคร้	ND	1,600(17.86)	1,600(17.86)	1,600(17.86)	1,600(17.86)	3,200(8.93)
ใบพลู	ND	ND	1,600(17.86)	1,600(17.86)	1,600(17.86)	3,200(8.93)
ใบมะกรูด	ND	ND	800(35.71)	800(35.71)	400(71.43)	1,600(17.86)
ผลมะกรูด	ND	ND	1,600(17.86)	800(35.71)	1,600(17.86)	1,600(17.86)
<u>สารสกัดจากพืชพื้นบ้าน</u>						
กระถิน	400(1,250)	ND	400(1,250)	400(1,250)	400(1,250)	100(5,000)
กระเจี๊ยบแดง	100(5,000)	200(2,500)	800(625)	1,600(312.5)	800(625)	1,600(312.5)
บัวบก	ND	ND	100(5,000)	200(2,500)	100(5,000)	200(2,500)
แมงลัก	ND	ND	200(2,500)	200(2,500)	200(2,500)	200(2,500)
ยอ	ND	ND	ND	100(5,000)	100(5,000)	ND
ลูกใต้ใบ	ND	200(2,500)	1,600(312.5)	800(625)	6,400(78.1)	6,400(78.1)

หมายเหตุ ¹ ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), LT = *Lactobacillus* sp.

สายพันธุ์ H15, MM = *M. morgani* ATCC 25830, PB = *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์

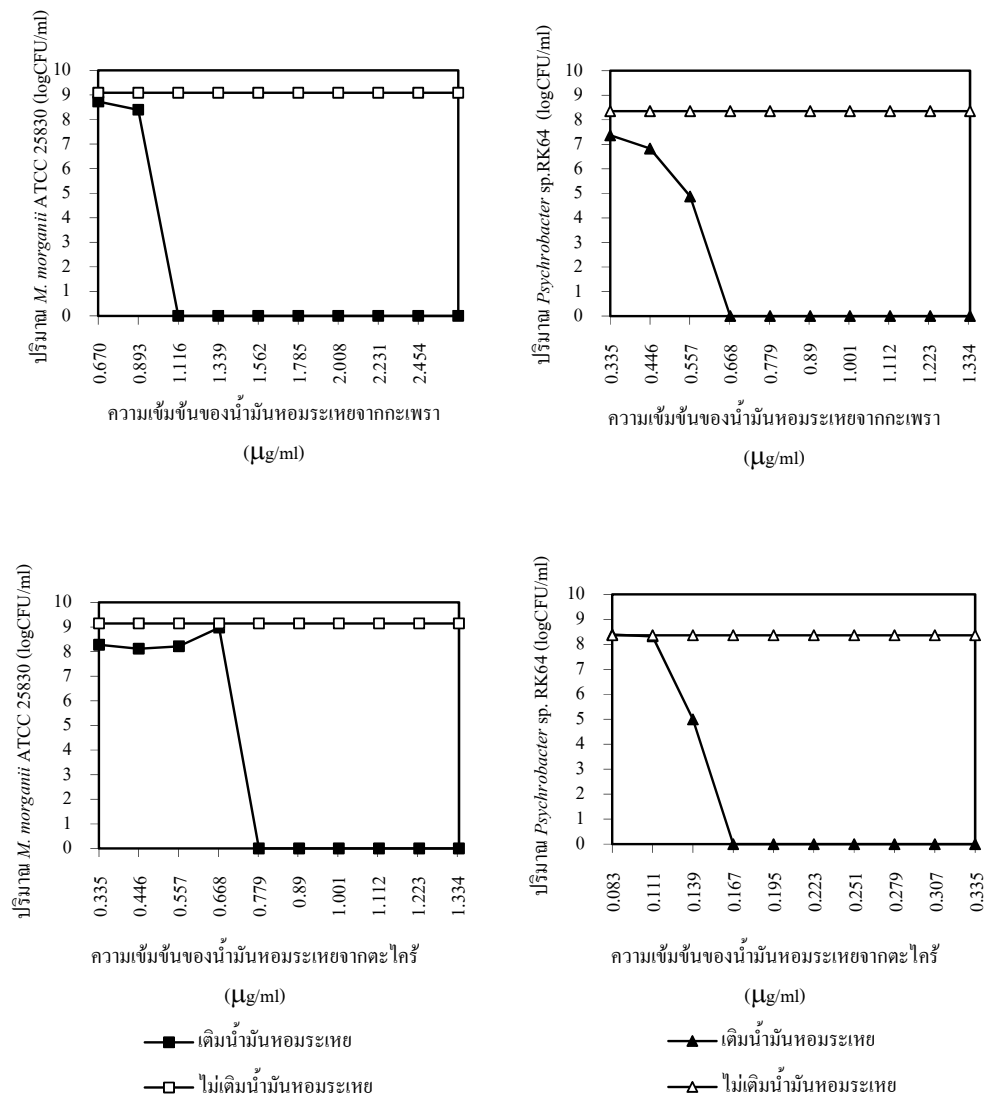
RK64, ND = ไม่ได้ทำการทดสอบ

6. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่สามารถยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration; MIC) และฆ่าทำลายแบคทีเรีย (minimal bactericidal concentration; MBC)

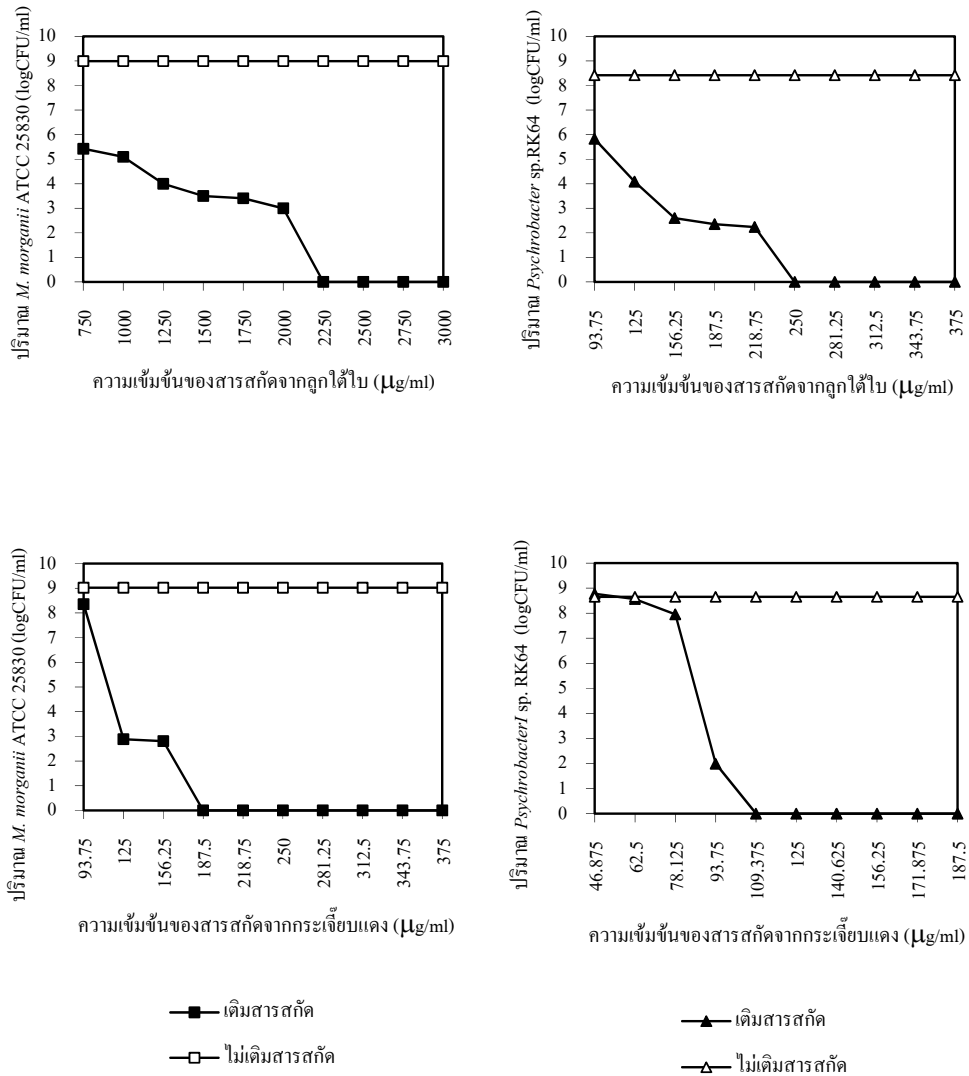
จากผลการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลายแบคทีเรียที่สร้างอิสรามีนจำนวน 2 สายพันธุ์คือ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 โดยใช้ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง และสารสกัดจากลูกใต้ใบเป็นสารต้านจุลชีพ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 5 และภาพที่ 6

ซึ่งพบว่าสารต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์แบบฆ่าทำลายเชื้อ (bactericide) เมื่อใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากสามารถลดจำนวนของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองในชุดควบคุม โดยพบว่าสารต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ได้ดีกว่า *M. morgani* ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่ใช้ (ตารางที่ 14) และพบว่าค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อแบคทีเรียที่สร้างอิสรามีนมีค่าต่ำกว่าสารต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เท่ากับ 0.14 และ 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลายแบคทีเรียทดสอบรองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ค่าเท่ากับ 0.56 และ 0.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 เท่ากับ 1.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ผลของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64



ภาพที่ 6 ผลของสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

ตารางที่ 14 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลาย *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

สารต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)			
	<i>M. morgani</i> ATCC 25830		<i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	
	MIC	MBC	MIC	MBC
น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา	1.12	1.12	0.56	0.67
น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้	0.78	0.78	0.14	0.17
สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง	125	187.5	93.75	109.38
สารสกัดจากลูกใต้ใบ	2250	2250	250	250

จากผลการทดลองยังพบอีกว่าสารสกัดด้วย ethanol ของกระเจี๊ยบแดงและลูกใต้ใบมีค่า MIC และ MBC สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราและตะไคร้หลายเท่า โดยพบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านจุลชีพดีกว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบ เนื่องจากมีค่า MIC และ MBC ต่ำกว่า ทั้งต่อเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 เท่ากับ 125 และ 187.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ รวมถึงมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เท่ากับ 93.75 และ 109.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากลูกใต้ใบพบว่า มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 สูงกว่า *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เกือบ 10 เท่า คือ 2,250 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการศึกษาค่า MIC และ MBC กับค่า activity unit ที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.2 (ผลการทดลองในตารางที่ 13) นั้น มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการที่ใช้ในการศึกษาแตกต่างกัน โดยพบว่าการเติมสารต้านจุลชีพลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่ใช้ในการศึกษาค่า MIC และ MBC นั้น จะทำให้สารต้านจุลชีพที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่าวิธีการหดยาสารต้านจุลชีพลงในผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้ในการศึกษาค่า activity unit ดังนั้นสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลวได้ (Pattaratanawadee *et al.*, 2006) นอกจากนี้การทดสอบหาค่า activity unit เป็นวิธีการทดลองที่มีการเจือจางสารต้านจุลชีพอย่างคร่าว ๆ โดยเจือจางสารต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 2 เท่า แต่วิธีการหาค่า MIC

และ MBC นั้น ทำการเจือจางสารต้านจุลชีพอย่างละเอียดกว่า โดยเจือจางสารต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 1.25 เท่า อีกทั้งเป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับในการนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพ ดังนั้นจึงคัดเลือกชนิดของสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไปจากผลการทดลองหาค่า MIC และ MBC นั้นคือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

พฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งออกฤทธิ์เป็นสารต้านจุลชีพที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ คือ geranial, nerol และ limonene ซึ่งมีอยู่ถึง 32.7, 12.5 และ 3.1% ตามลำดับ (Cimanga *et al.*, 2002) โดยสารดังกล่าวมีผลในการยับยั้งการเจริญทั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร เช่น pathogenic *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *P. phosphoreum*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* และเชื้อรา เช่น *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า MIC ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม มีค่าอยู่ระหว่าง 1-8, 0.1-1 และ 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ปทุม และคณะ, 2550; Mejlholm and Dalgaard, 2002; Oussalah *et al.*, 2007)

ในน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรามี eugenol และ caryophyllene เป็นพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ โดยมีอยู่ประมาณ 27.50 และ 20.13% ตามลำดับ (Jaisai and Lamlertthon, 2007) สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบางชนิด เช่น *B. cereus*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus* (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005; Prabuseenivasan *et al.*, 2006) โดยมีค่า MIC ต่อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 3 ชนิดเท่ากับ 40, 4.2 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง นอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิซทาไมนที่ใช้ทดสอบได้แล้ว ยังพบว่าสารสกัดด้วย methanol ของพืชดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *C. sporogenes*, *Micrococcus luteus* และ *K. pneumoniae* โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 300-1,300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Tolulope, 2007) โดยสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมี cardiac glycosides, saponins, alkaloids และ flavonoids เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่พบตามผิวหนังของคน คือ *P. acnes* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2,500 และ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Chomnawang *et al.*, 2005)

สารสกัดจากลูกใต้ใบ พบว่ามี phyllanthin, hypophyllanthin, tannin และสารประกอบ phenolic เป็นองค์ประกอบหลัก (Khattoon *et al.*, 2006) สารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* โดยมีค่า MIC ของสารสกัดด้วย acetone เท่ากับ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และมีค่า MIC ของสารสกัดด้วย methanol และ ethanol ต่อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด อยู่ระหว่าง 150-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (Dabur *et al.*, 2007) และ 1,000-4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (Kloucek *et al.*, 2005)

7. การศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้

7.1 ความเป็นกรดต่าง

จากผลการปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ จากค่าปกติคือ 5.7 ให้เป็นระหว่าง 5-9 พบว่าค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อบางค่ามีผลต่อสารต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความกรดต่างอื่น ๆ ในการต้านการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 โดยมีรายละเอียดดังนี้

M. morgani ATCC 25830 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 5, 5.7, 8 และ 9 ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 โดยสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรียดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (ภาพที่ 7) เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นที่วัดได้ และค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นเล็กน้อย รวมถึงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบ ($0 \log\text{CFU/ml}$) และปริมาณฮิสตามีนที่เกิดขึ้น (33.81 ppm) มีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยและปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 6 และ 7 เท่านั้น ที่ *M. morgani* ATCC 25830 สามารถเจริญได้ โดยสามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็น 6.39 และ 6.99 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 6.63 และ 7.38 $\log\text{CFU/ml}$ และมีปริมาณฮิสตามีนเท่ากับ 980.02 และ 48.40 ppm ตามลำดับ

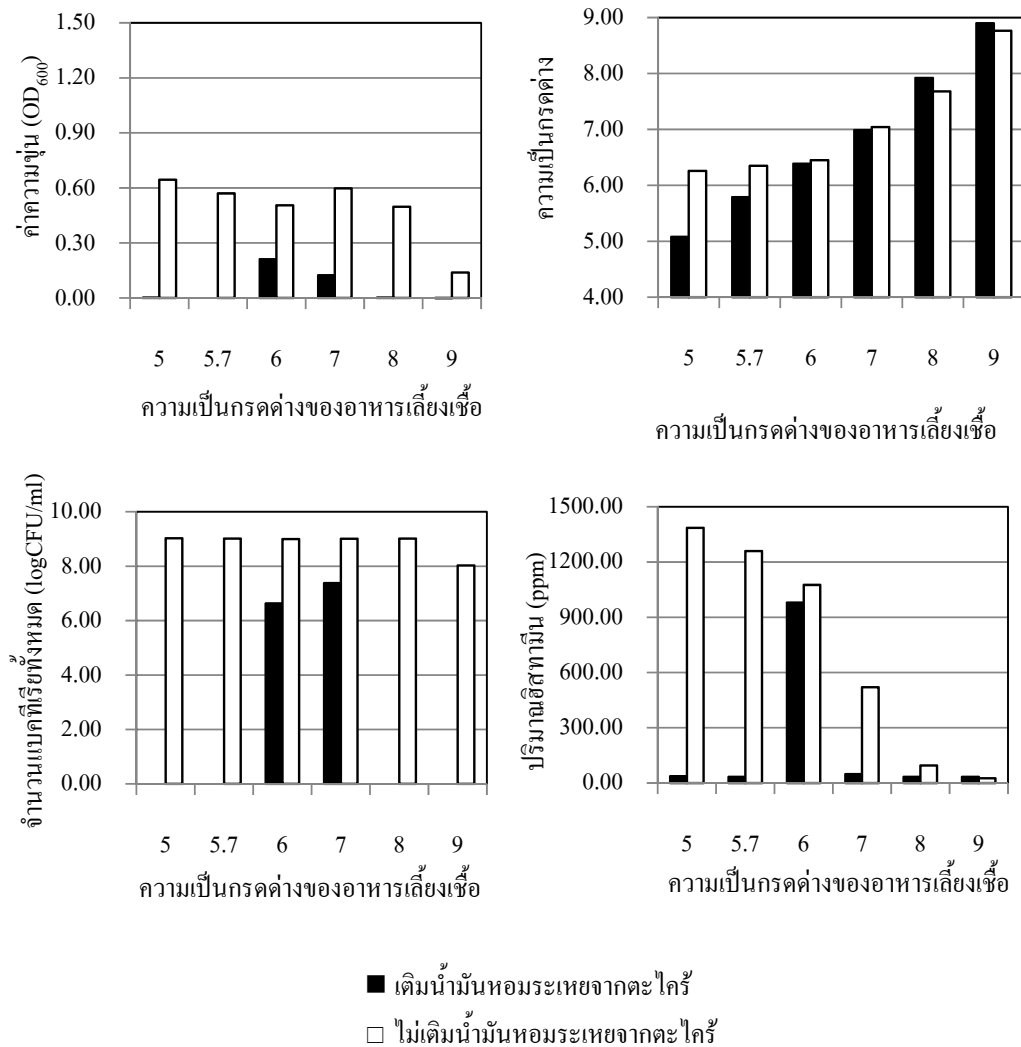
Psychrobacter sp. สายพันธุ์ RK64 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้และปรับความเป็นกรดต่างเป็น 5, 5.7, 7, 8 และ 9 มีผลยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของ เชื้อ (ภาพที่ 8) โดยมีค่าความขุ่น ความเป็นกรดต่าง และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด เช่นเดียวกับผล การทดลองของ *M. morgani* ATCC 25830 และมีปริมาณฮิสตามีนที่เกิดขึ้นเท่ากับ 32.39 ppm โดย อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยและปรับความเป็นกรดต่างเป็น 6 เท่านั้นที่ไม่สามารถยับยั้ง การเจริญและการสร้างฮิสตามีนของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ได้ โดยเพิ่มค่าความเป็น กรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไปเป็น 6.16 และมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 5.24 logCFU/ml รวมทั้งมีปริมาณฮิสตามีนเท่ากับ 42.13 ppm

ถึงแม้ว่า *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 จะ สามารถเจริญและสร้างฮิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และปรับค่า ความเป็นกรดต่างเป็น 6 และ 7 ได้ แต่พบว่าการเจริญและสร้างฮิสตามีนนั้นมีค่าน้อยกว่าผลการ ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากัน

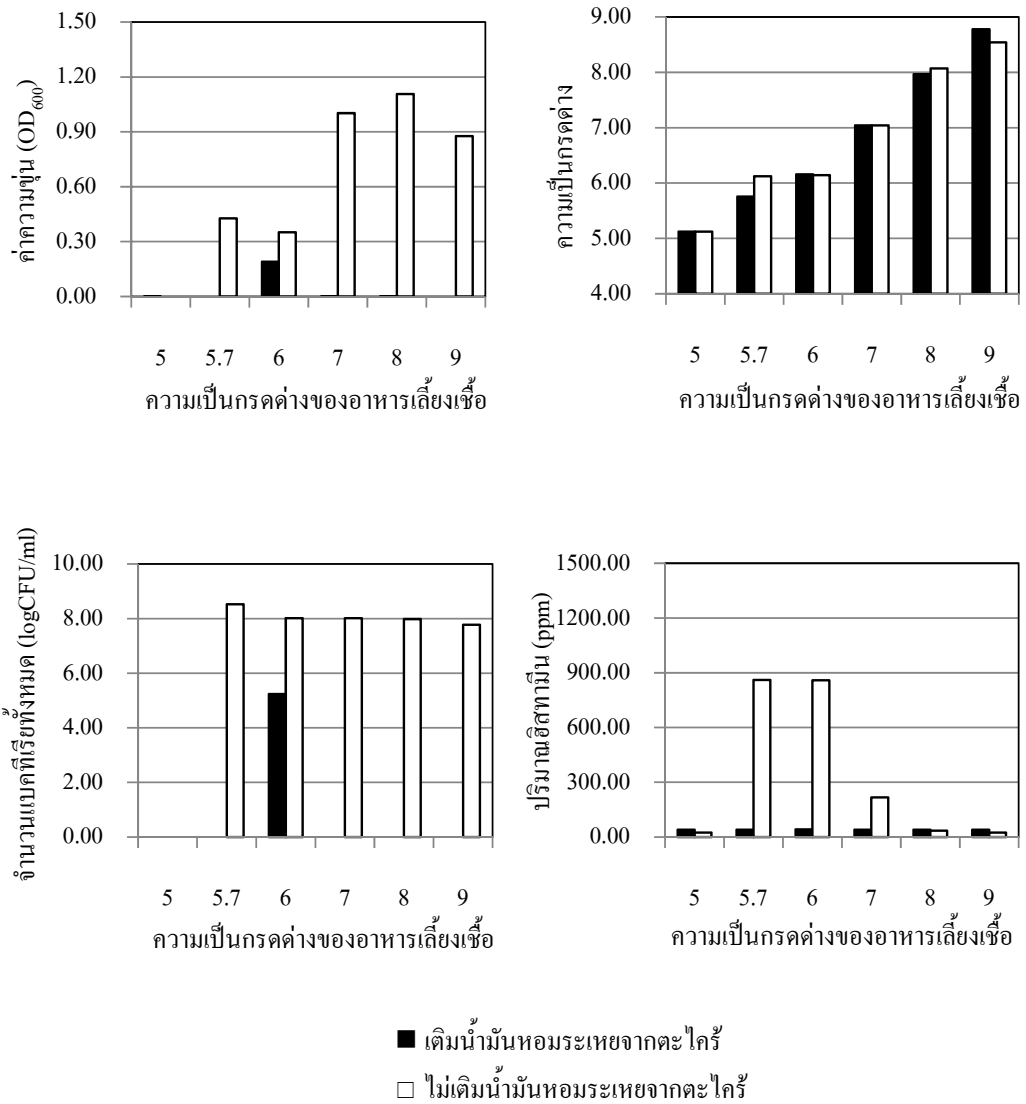
งานวิจัยที่ผ่านมาในอดีตส่วนใหญ่พบว่าสารต้านจุลชีพจะใช้ได้ผลดี เมื่ออาหารเลี้ยง เชื้อมีค่าความเป็นกรดต่างต่ำ ดังผลการทดลองของ Koutsoumanis *et al.* (1999) ที่เติมน้ำมันหอม ระเหยจากออริกานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปรับค่าความเป็นกรดต่าง พบว่าน้ำมันหอมระเหย ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. enteritidis* ได้ดีเมื่อมีค่าความเป็นกรดต่างต่ำ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำ จะทำให้น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติไม่มีขั้ว (hydrophobic) มากขึ้น จึงละลายเข้าสู่ส่วนไขมัน (lipid phase) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ดี

นอกจากน้ำมันหอมระเหยจะใช้ได้ผลดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำแล้ว จาก ผลการทดลองยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีประสิทธิภาพดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความ เป็นกรดต่างสูง เช่นเดียวกับผลการใช้ citral (geranial) ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบใน น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวมีประสิทธิภาพ เพิ่มขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น (Onawunmi, 1989) เนื่องจากค่าความ เป็นกรดต่างที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีการดูดซึมสารต้านจุลชีพได้ดีขึ้น

จะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มาใช้เป็นสารต้านจุลชีพในผลิตภัณฑ์ประมงประเภทหมักดอง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างเมื่อผ่านการแปรรูปแล้ว รวมทั้งอาจใช้ผสมในน้ำล้างวัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ซึ่งมีความเป็นกรดต่างประมาณ 7.5 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน



ภาพที่ 7 ผลของความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย *M. organii* ATCC 25830



ภาพที่ 8 ผลของความป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างอิตทามีนของแบคทีเรีย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

7.2 อุณหภูมิ

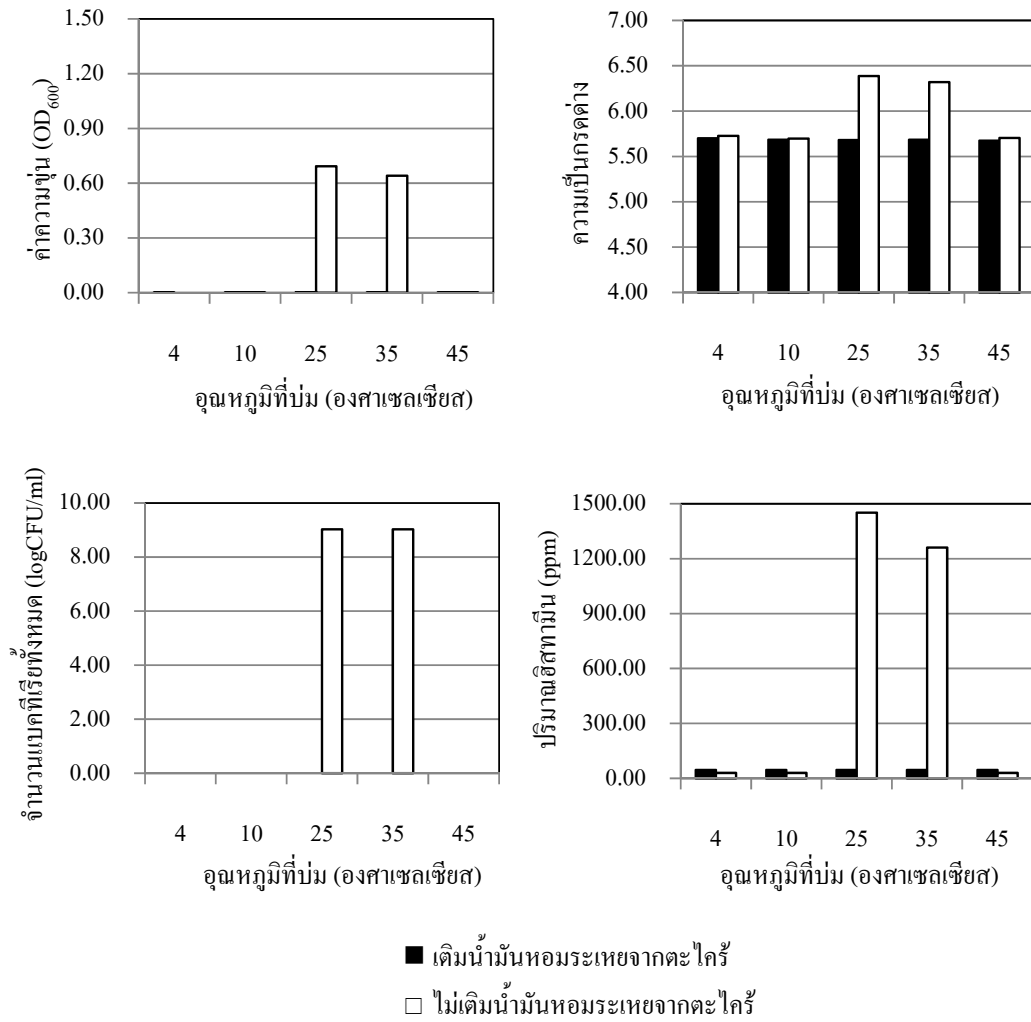
จากผลการทดลองในภาพที่ 9 และ 10 พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ (4-45 องศาเซลเซียส) ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยพบว่า *M. organii* ATCC 25830 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เท่านั้น (ภาพที่ 9) และสามารถสร้างอิสตามีนได้ 1,451.59 และ 1,260.45 ppm ตามลำดับ แต่พบว่าเมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE มีผลทำให้ *M. organii* ATCC 25830 ไม่สามารถเจริญและสร้างอิสตามีนได้

ในขณะที่ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 สามารถเจริญได้เล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างอิสตามีนได้เล็กน้อยเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำ แต่เมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HE พบว่าสารดังกล่าวมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างอิสตามีนของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่บ่มในทุกอุณหภูมิดังกล่าว (ภาพที่ 10)

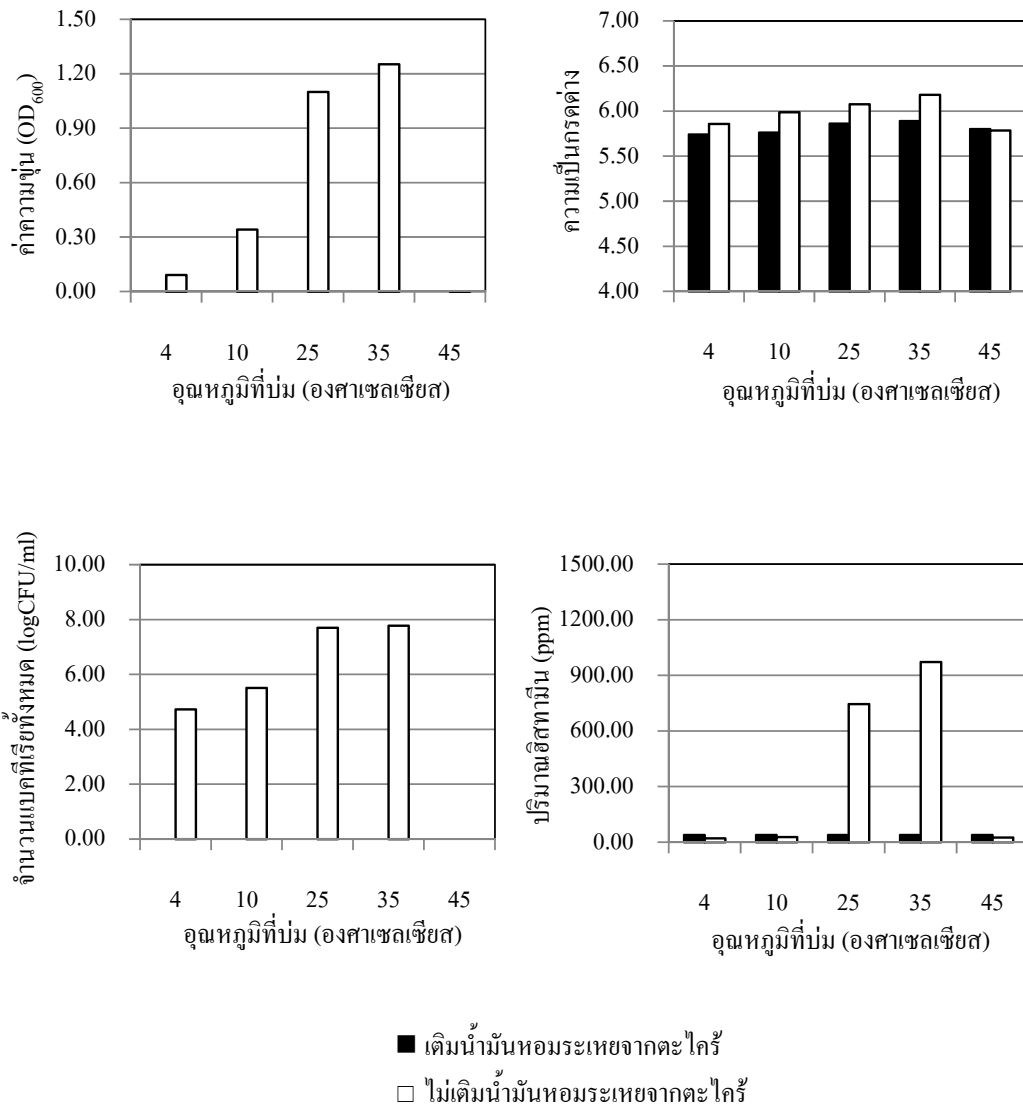
ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองเติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ตะไคร้ ออริกาโน ไทม์ และกานพลู ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *P. phosphoreum* (Mejlholm and Dalgaard, 2002) และ *E. coli* O157: H7 (Burt and Reinders, 2003) เป็นแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งพบว่าการบ่มเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ลดลง จากผลการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

ในระหว่างการขนส่งจากเรือประมงจนถึงผู้บริโภค อาจมีการปล่อยให้วัตถุดิบปลาอยู่ในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญและสร้างอิสตามีนของแบคทีเรีย จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีความคงตัวต่ออุณหภูมิต่าง ๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มาใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีน โดยอาจใช้ผสมกับวัตถุดิบปลาโดยตรงหรือผสมในน้ำแข็งที่ใช้凍ปลา เพื่อช่วยลดปัญหาที่อาจเกิดจากการผสมปลากับน้ำแข็งอย่างไม่สม่ำเสมอ รวมทั้งการใช้ร่วมกับกระบวนการแปรรูปอาหารที่

ต้องใช้อุณหภูมิสูง เช่น การทำปลาเค็ม ซึ่งในระยะแรกของการแปรรูป เกลือยังไม่แทรกซึมเข้าสู่เนื้อปลาอย่างทั่วถึง



ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย *M. morganii* ATCC 25830

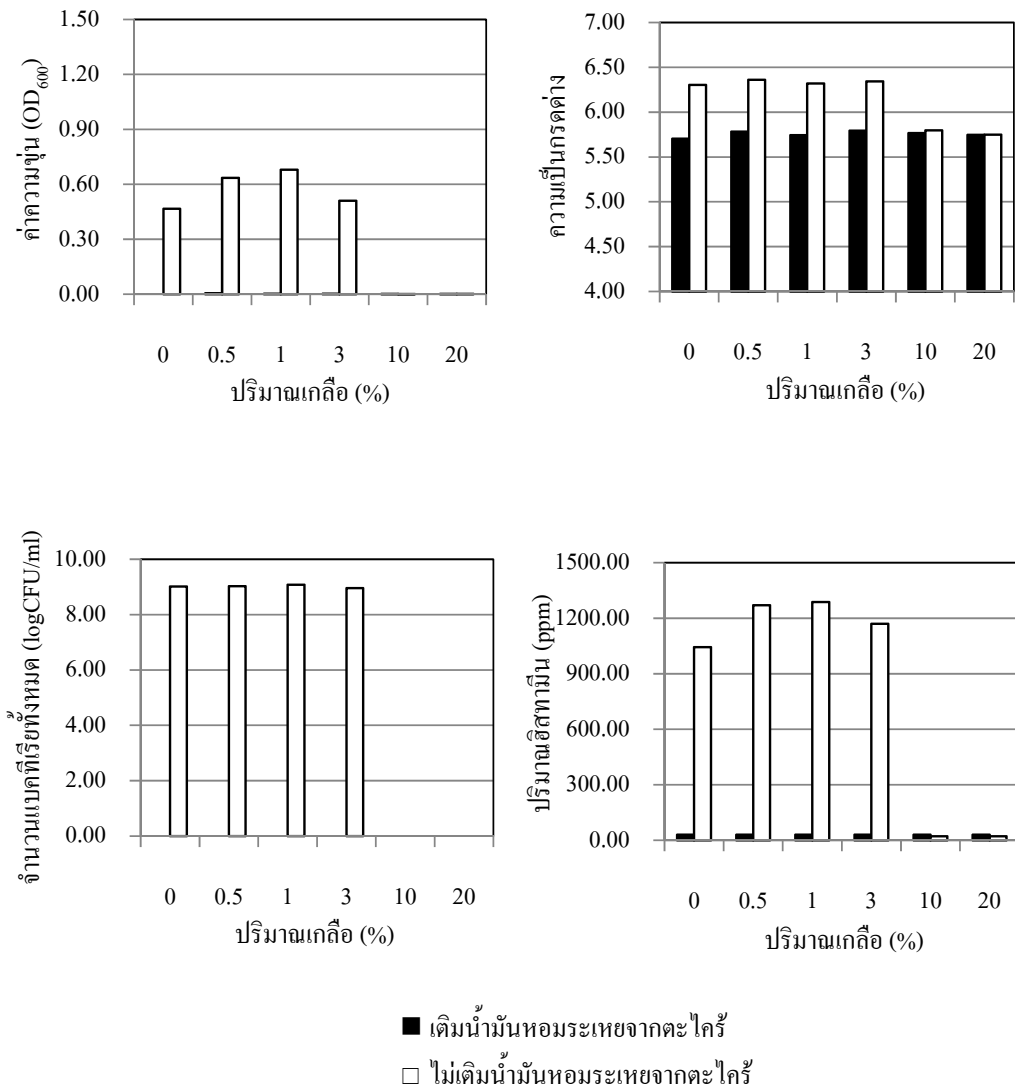


ภาพที่ 10 ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างอิสตามีนของแบคทีเรีย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

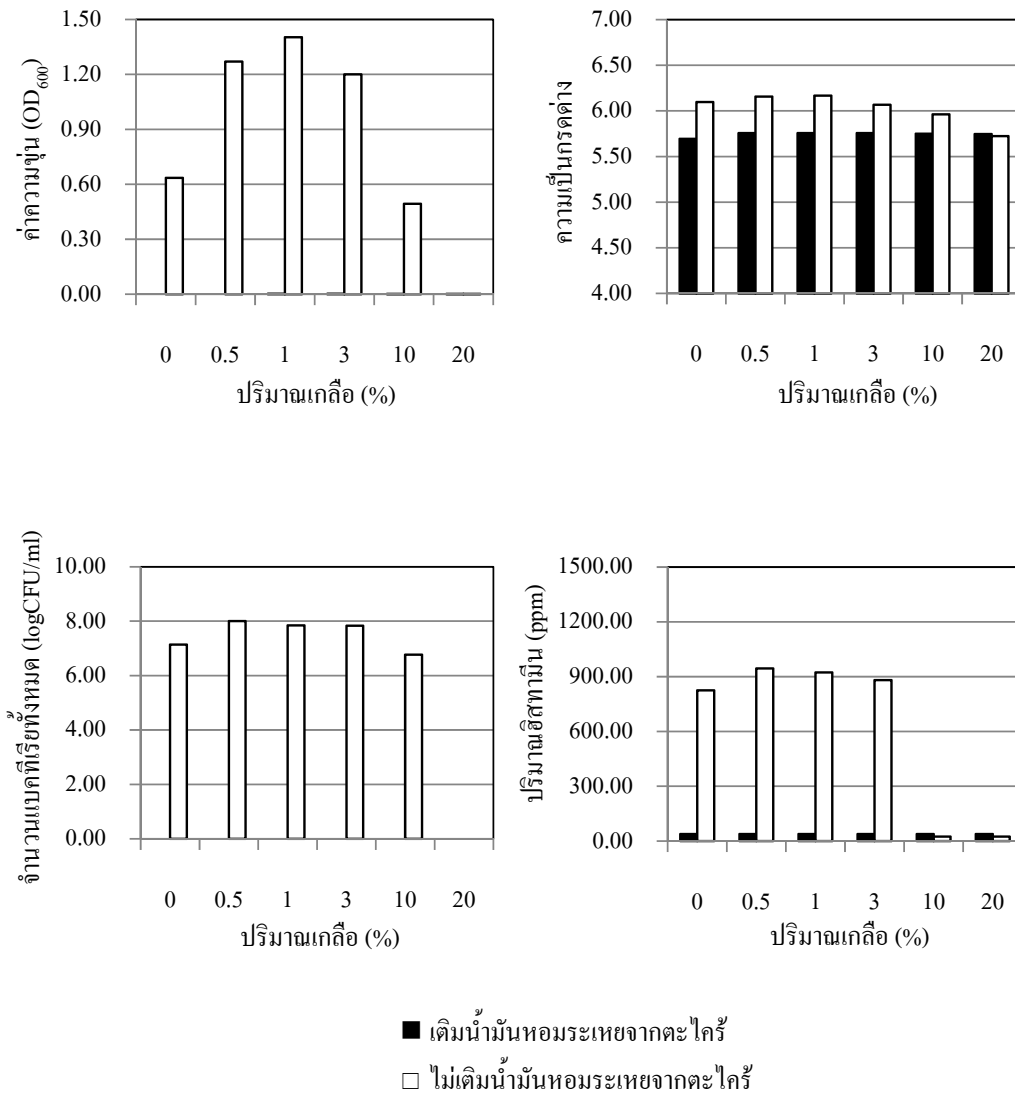
7.3 ปริมาณเกลือ

เมื่อปรับความเข้มข้นของเกลือในอาหาร HE จากค่าปกติคือ 0.5% ให้เป็น 0, 0.5, 1, 3, 10 และ 20% ตามลำดับ พบว่าปริมาณเกลือไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการต้านการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนทั้ง 2 ชนิด ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และเติมเกลือให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยพบว่า *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ไม่สามารถเจริญและสร้างฮิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และมีปริมาณเกลือต่าง ๆ แต่สามารถเจริญได้ในอาหาร HE ที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และมีความเข้มข้นของเกลืออยู่ระหว่าง 0-3 % และ 0-10% ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ 12) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือสูงถึง 10% ซึ่งต่างจาก *M. morgani* ATCC 25830 ทั้งนี้เนื่องจาก *Psychrobacter* เป็นแบคทีเรียที่ทนเกลือ (halotolerant) กล่าวคือสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือต่ำ (0-3%) และสามารถเจริญได้เล็กน้อยในอาหารที่มีเกลือ 10% แต่ไม่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีผลยับยั้งการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ได้ในทุกระดับความเข้มข้นของเกลือที่เติมลงไป

ผลิตภัณฑ์ประมงที่มีปริมาณเกลือมากกว่า 10% เช่น ปลาเค็ม ปลาจ๋า หรือน้ำปลา (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม [สมอ.], 2546; สมอ., 2547; สมอ., 2549) พบว่าปริมาณเกลือดังกล่าว จะสามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้อาจมีการเจริญของแบคทีเรียและสร้างฮิสตามีนได้ ถ้ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนกลุ่มที่ชอบและทนเกลือ (halophilic และ halotolerant) เช่น *S. epidermidis*, *S. capitis* และ *Tetragenococcus muriaticus* (Hernandez-Herrero *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2001) จึงอาจประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้ เนื่องจากปริมาณเกลือไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้นั้นลดลง



ภาพที่ 11 ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย *M. morgani* ATCC 25830



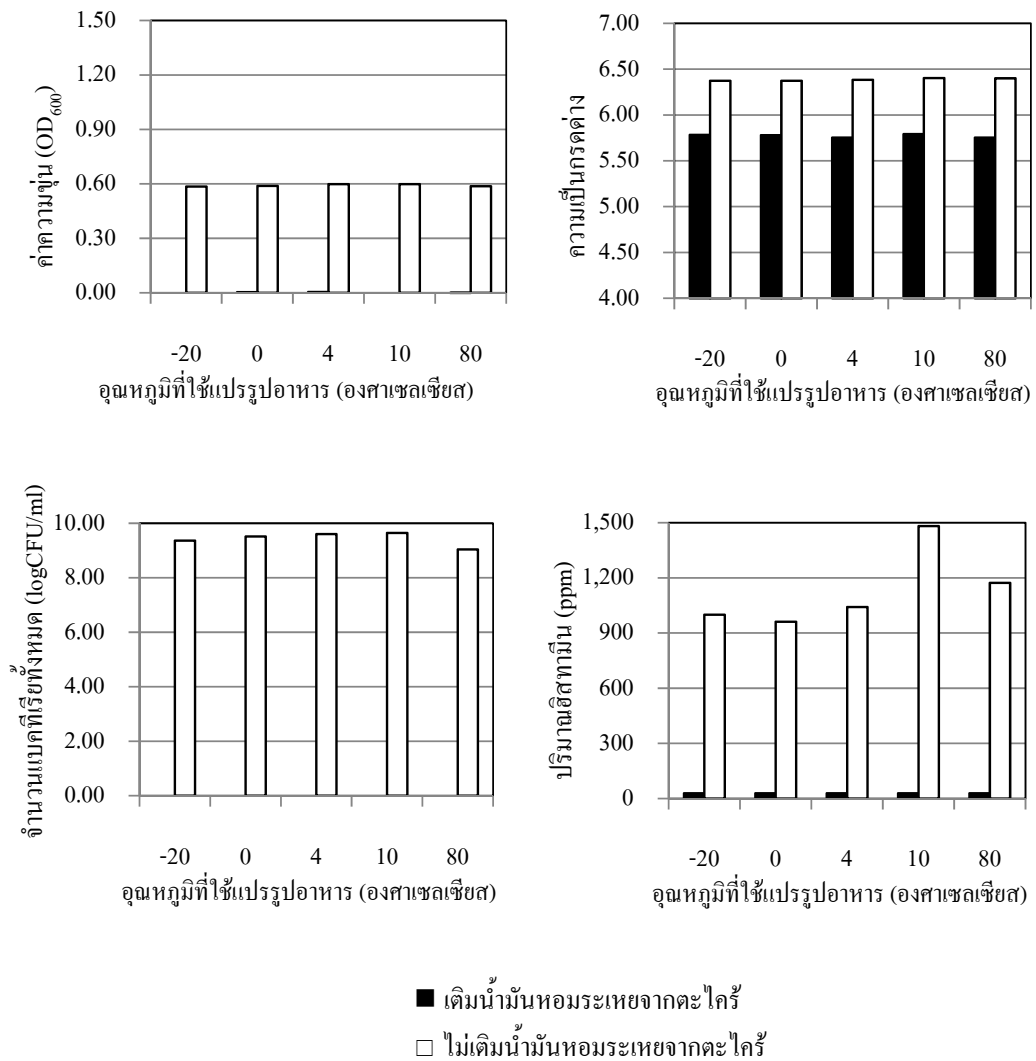
ภาพที่ 12 ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

7.4 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร

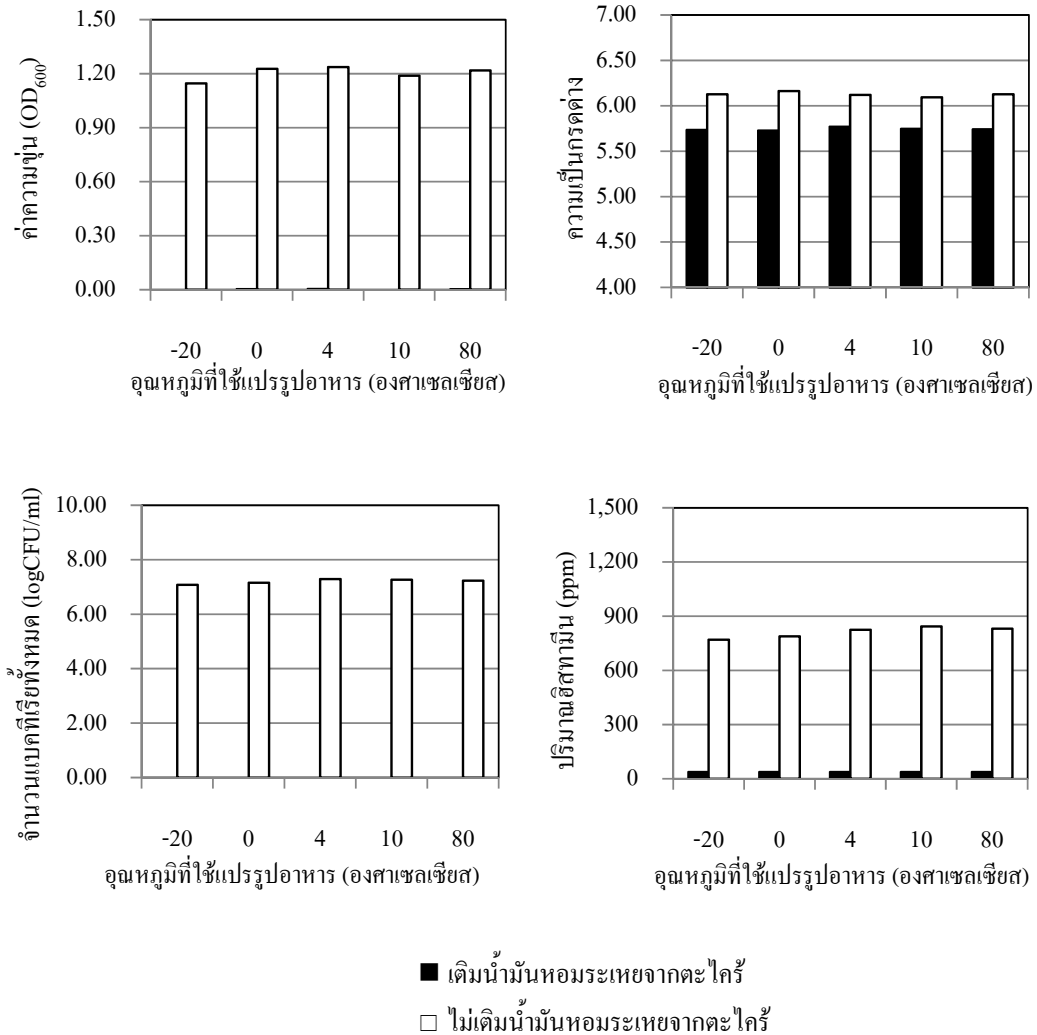
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย โดยเก็บน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งใช้สำหรับการแปรรูปผลิตภัณฑ์ประมงคือ การแช่เยือกแข็ง การเก็บในน้ำแข็ง การเก็บในตู้เย็น การละลายน้ำแข็ง และการทำให้สุก โดยมีอุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้คือ -20, 0, 4, 10 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เพื่อทดสอบความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ พบว่าการเก็บน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการต้านการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยพบว่าปริมาณแบคทีเรียทดสอบลดลงจาก 3.5 logCFU/ml เป็น 0 logCFU/ml เมื่อระยะเวลาในการบ่มครบ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 13 และ 14)

ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของอุยามาส (2548) และ Hsieh *et al.* (2001) ที่ทำการทดสอบความคงตัวของความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปและการต้ม (ระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส) ของสารสกัดจากข่า กระเทียม และสารผสมของกุยช่าย อบเชย และขมิ้น พบว่าอุณหภูมิดังกล่าว ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus* และ *A. flavus* ลดลง

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ประมงได้ทั้งในผลิตภัณฑ์ที่ต้องแช่เยือกแข็ง เก็บในน้ำแข็ง หรือเก็บในตู้เย็น รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ต้องผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็ง การละลายน้ำแข็ง หรือทำให้สุก ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในระดับโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานแช่เยือกแข็งอาหารทะเลที่ต้องมีการแช่เยือกแข็งผลิตภัณฑ์ หรือคลังวัตถุดิบไว้ในน้ำแข็ง โรงงานปลากระป๋องที่ต้องมีการละลายตัวอย่างที่ผ่านการแช่เยือกแข็งมาแล้ว หรือการทำให้สุกก่อนการนำไปบรรจุกระป๋อง รวมทั้งผู้ค้าอาหารทะเลสดและผู้บริโภค ก็สามารถนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มาใช้เป็นสารต้านจุลชีพได้ ในวัตถุดิบที่ต้องคงในน้ำแข็งและเก็บในตู้เย็น เป็นต้น



ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรีย *M. morgani* ATCC 25830



ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและสร้างอิฐตามินของแบคทีเรีย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

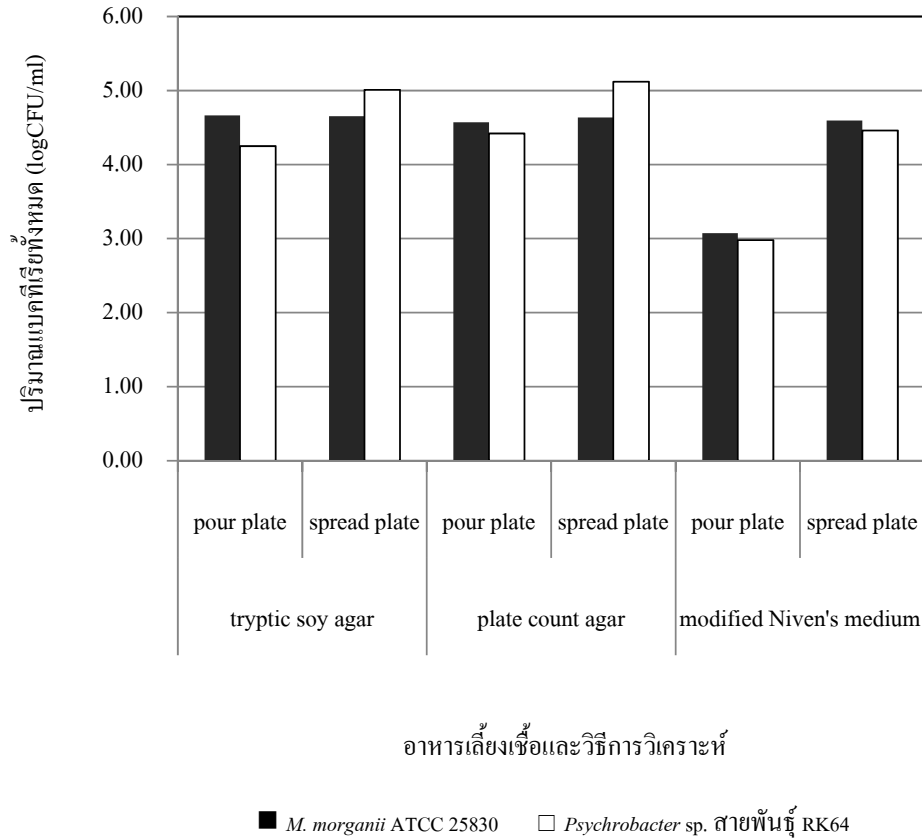
นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้ทำการทดลองแล้ว ยังพบว่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพและปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ ต่างก็มีผลต่อประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพเช่นกัน ดังเช่นผลการทดลองนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบสน ความเข้มข้น 2, 5 และ 10% มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. culmorum*, *F. poae* และ *F. solani* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสนที่มีความเข้มข้น

สูงกว่า จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้ดีกว่า (Krauze-Baranowska *et al.*, 2002) และจากผลการทดลองนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืช *Satureja thymba* และ *Satureja parnassica* มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart broth ให้มีความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.5% เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Salmonella Enterica* ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^2 และ 10^5 CFU/ml พบว่าเมื่อปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่เพียงพอในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบก็ต้องมากขึ้นตามไปด้วย (Chorianopoulos *et al.*, 2006)

8. การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการลดปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในระบบจำลองของอาหาร

8.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *M. organii* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 โดยวิธี pour plate และ spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA, PCA และ mNM โดยใช้ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 10^4 CFU/ml พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งวิธี pour plate และ spread plate (แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ, $p > 0.05$) (ภาพที่ 15) แต่ผลการนับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ mNM พบว่าจำนวนโคโลนีที่มีสีม่วงอมฟ้าและ โชนสีม่วงล้อมรอบ ที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี pour plate มีค่าน้อยกว่าจำนวนโคโลนีที่นับได้จากวิธี spread plate อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่เจริญภายในชั้นวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สามารถเพิ่มค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงทำให้เห็นเป็นโคโลนีสีเหลือง และมีโชนสีเหลืองล้อมรอบ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Mavromatis and Quantick (2002) ที่ให้ทำการตรวจหาแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนโดยอาหาร Niven's medium ด้วยวิธี spread plate และนับจำนวนโคโลนีจากงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีไม่เกิน 80 โคโลนี ซึ่งจะสามารถสังเกตเห็น โชนสีม่วงที่ล้อมรอบโคโลนีได้อย่างชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน โดยวิธี spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ mNM ตามลำดับ

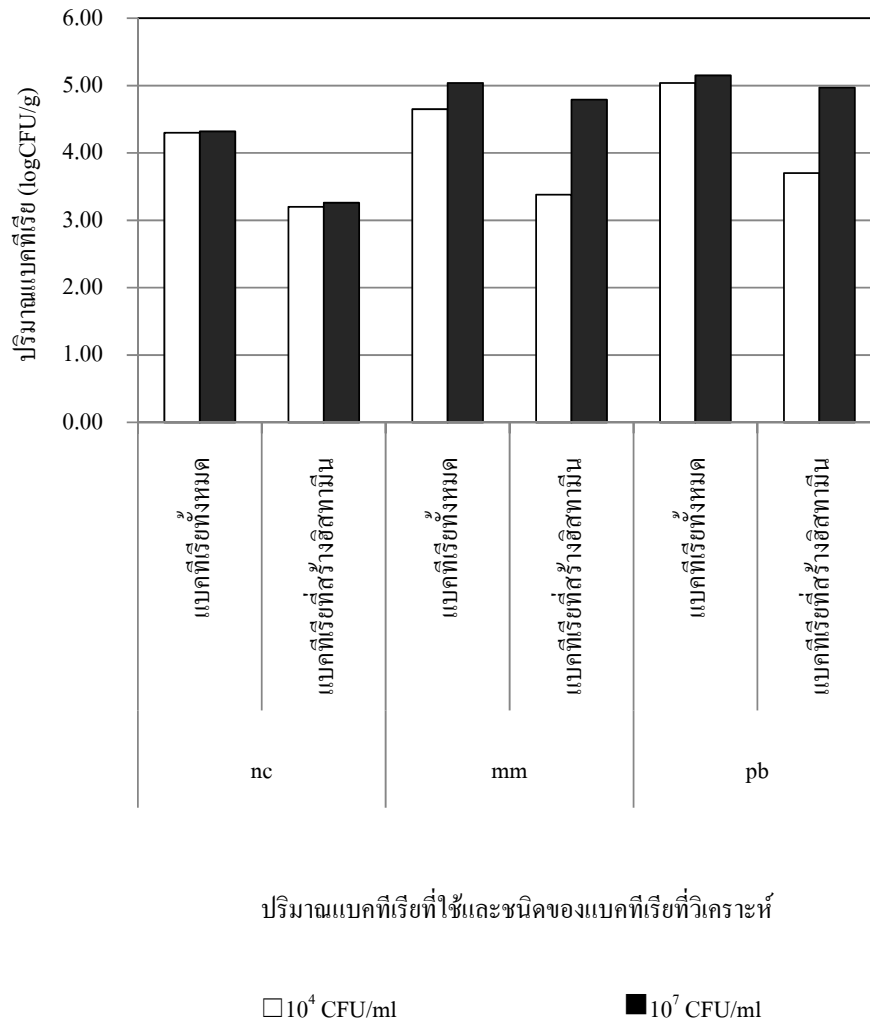


ภาพที่ 15 จำนวน *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

8.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทูสด

จากผลการทดลองขั้นต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างการปนเปื้อนของเชื้อ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 โดยการจุ่มปลาในสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^4 และ 10^7 CFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนทั้งหมดที่นับได้จากตัวอย่างปลาที่จุ่มในสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 CFU/ml มีปริมาณมากกว่าตัวอย่างปลาที่จุ่มในสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^4 CFU/ml ประมาณ 1.3 logCFU/g ($p < 0.05$) แต่ตัวอย่างปลาที่จุ่มในสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 CFU/ml มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าตัวอย่างปลาที่จุ่มในสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^4 CFU/ml เพียงเล็กน้อยคือ 0.25 logCFU/g ($p < 0.05$)

ดังนั้น ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการสร้างการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ 10^7 CFU/ml ซึ่งจะได้นำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้และชนิดของแบคทีเรียที่วิเคราะห์

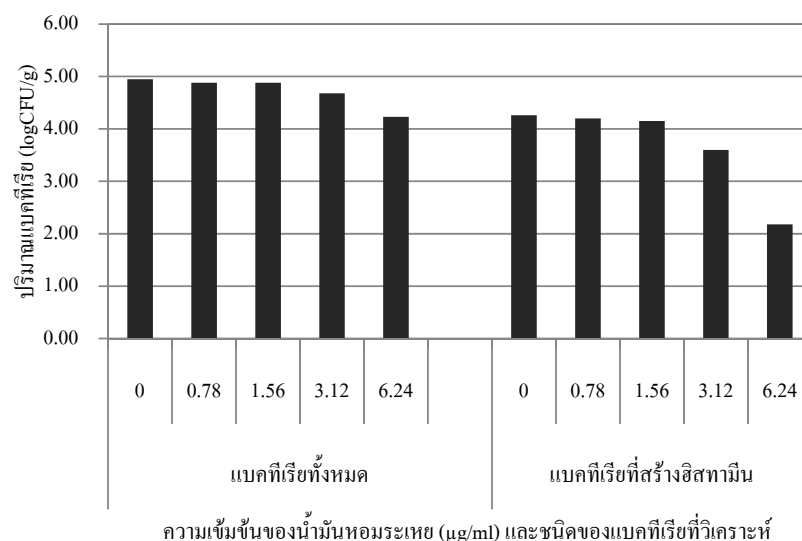
□ 10^4 CFU/ml

■ 10^7 CFU/ml

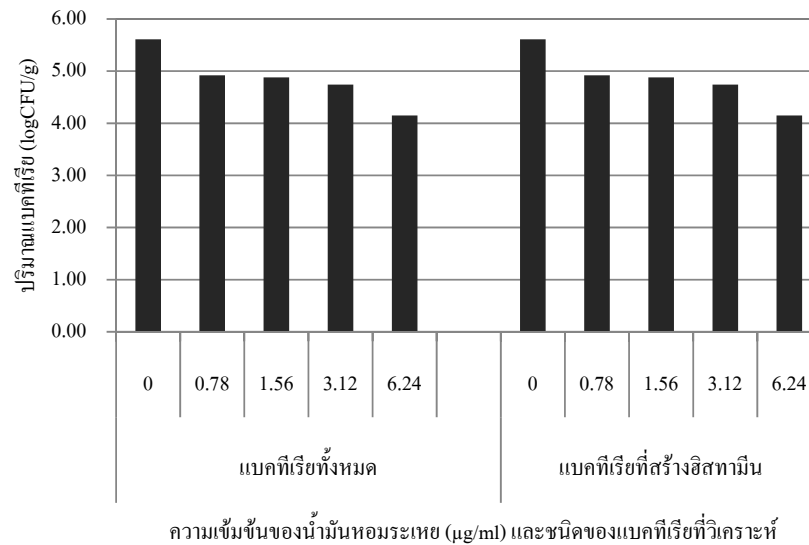
ภาพที่ 16 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างอิสรทามีนจากปลาทูสคที่จุ่มในสารละลาย ที่มีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างอิสรทามีนต่างกัน

8.3 ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทุสด

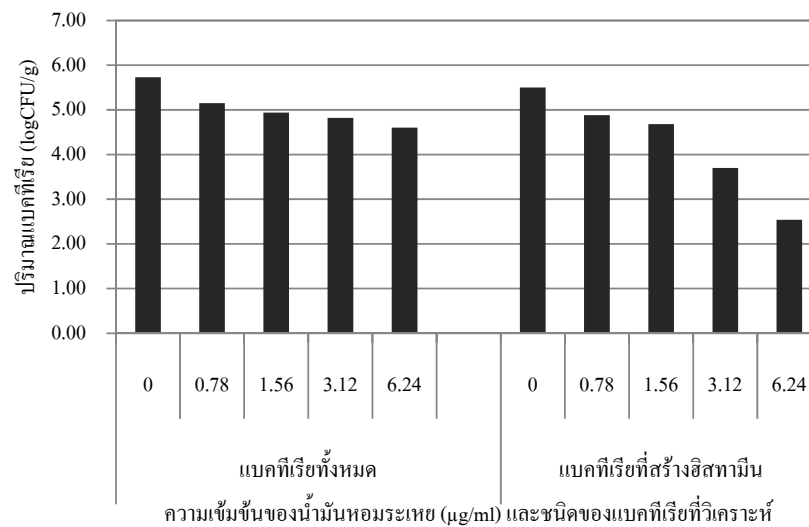
จากการทดลองขั้นต้นเพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง โดยการจุ่มปลาลงในสารละลายเชื้อที่มีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบเท่ากับ 10^7 CFU/ml แล้วจุ่มลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.78, 1.56, 3.12 และ 6.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ดังแสดงในภาพที่ 17, 18 และ 19 ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง แม้จะจุ่มปลาทุสดในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูงสุดคือ 6.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรแล้วก็ตาม จึงเป็นไปได้ว่าหากมีการจุ่มตัวอย่างปลาลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อาจทำให้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนลดลงหรือทำลายแบคทีเรียดังกล่าวได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้ ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เท่ากับ 6.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นอื่น ๆ มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนจากปลาทุสดที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน



ภาพที่ 18 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างอิมูโนจากปลาหูสดที่ปนเปื้อนด้วย *M.morganii* ATCC 25830 และจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน



ภาพที่ 19 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างอิมูโนจากปลาหูสดที่ปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

8.4 ความแตกต่างทางด้านประสาทสัมผัสของปลาที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างปลาสดและปลาหนึ่งที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 9 คน เพื่อเปรียบเทียบความเข้มของกลิ่นตะไคร้กับตัวอย่างปลาที่ไม่จุ่มในสารละลายดังกล่าว เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการใช้สารต้านจุลชีพนั้น เพื่อยับยั้งการเจริญหรือฆ่าทำลายการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย ไม่ใช่เพื่อการปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์ จึงต้องการให้เมื่อมีการจุ่มในสารต้านจุลชีพแล้ว คุณลักษณะด้านต่าง ๆ เช่น สี กลิ่น รส ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังคงเดิม แต่จากผลการทดลองพบว่าการใช้ น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับ คือ 0.78, 1.56, 3.12 และ 6.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการรับรู้กลิ่นตะไคร้ของผู้ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งตัวอย่างปลาสดและปลาหนึ่ง (ตารางที่ 15) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างปลาสดที่จุ่มในน้ำเปล่าแทนสารละลายน้ำมันหอมระเหย โดยที่ผู้ทดสอบไม่สามารถจำแนกระดับความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ใช้ได้จากระดับความเข้มของกลิ่นตะไคร้ ($p > 0.05$) ทั้งในตัวอย่างปลาสดและปลาหนึ่ง จึงเลือกระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดลองคือ 6.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาใช้ในการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการลดปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในระบบจำลองของอาหารต่อไป

ตารางที่ 15 คะแนนความเข้มของกลิ่นตะไคร้ที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของปลาหูสด และปลาหูหนึ่งที่จุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

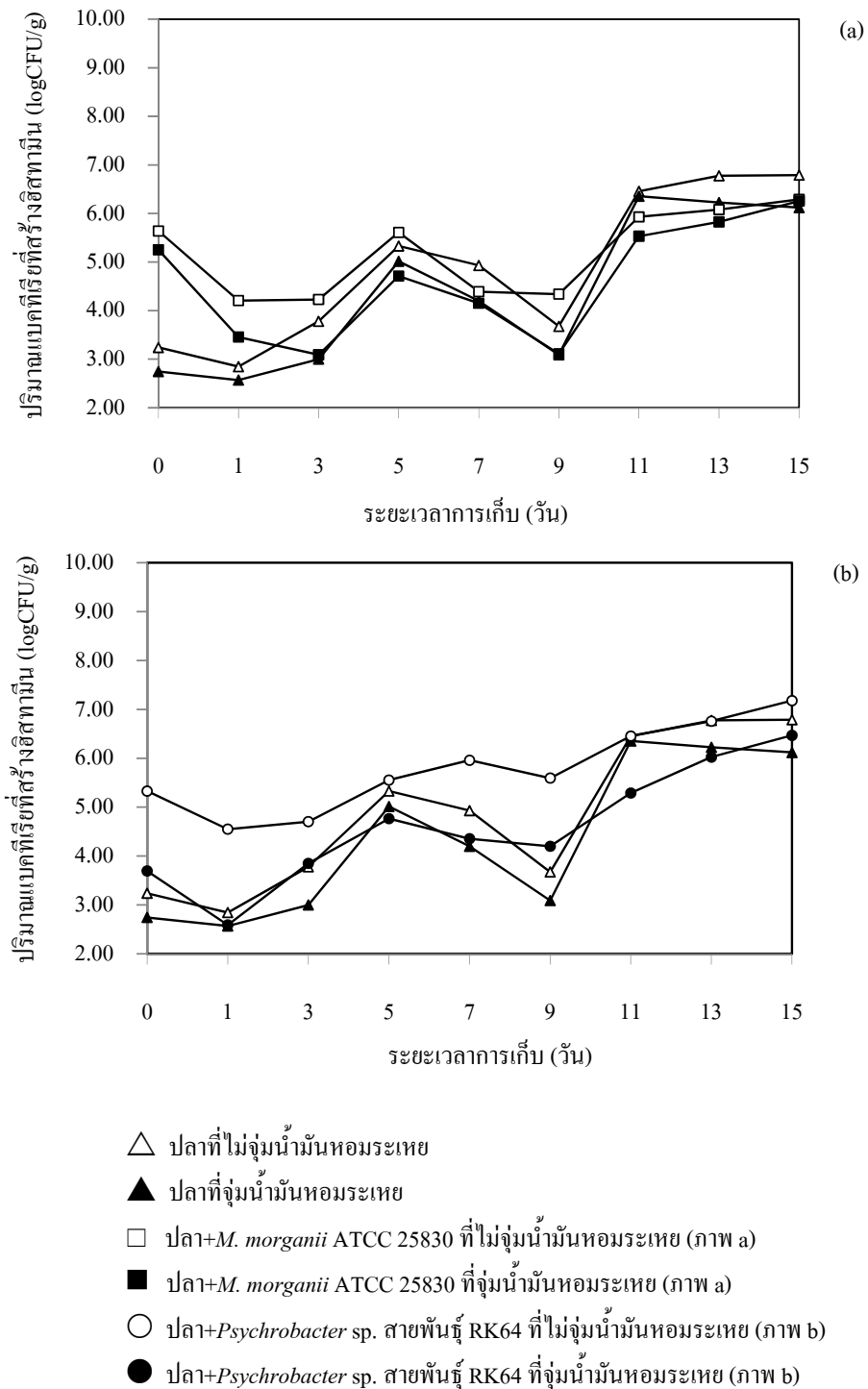
ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	คะแนนความเข้มของกลิ่นตะไคร้	
	ปลาหูสด	ปลาหูหนึ่ง
0.00	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
0.78	1.7±1.4 ^b	2.1±1.2 ^a
1.56	3.0±1.3 ^a	1.9±1.1 ^a
3.12	3.2±1.4 ^a	2.1±1.4 ^a
6.24	2.7±1.0 ^{ab}	2.6±1.2 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

8.5 ผลการใช้สารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนในปลาหูสด

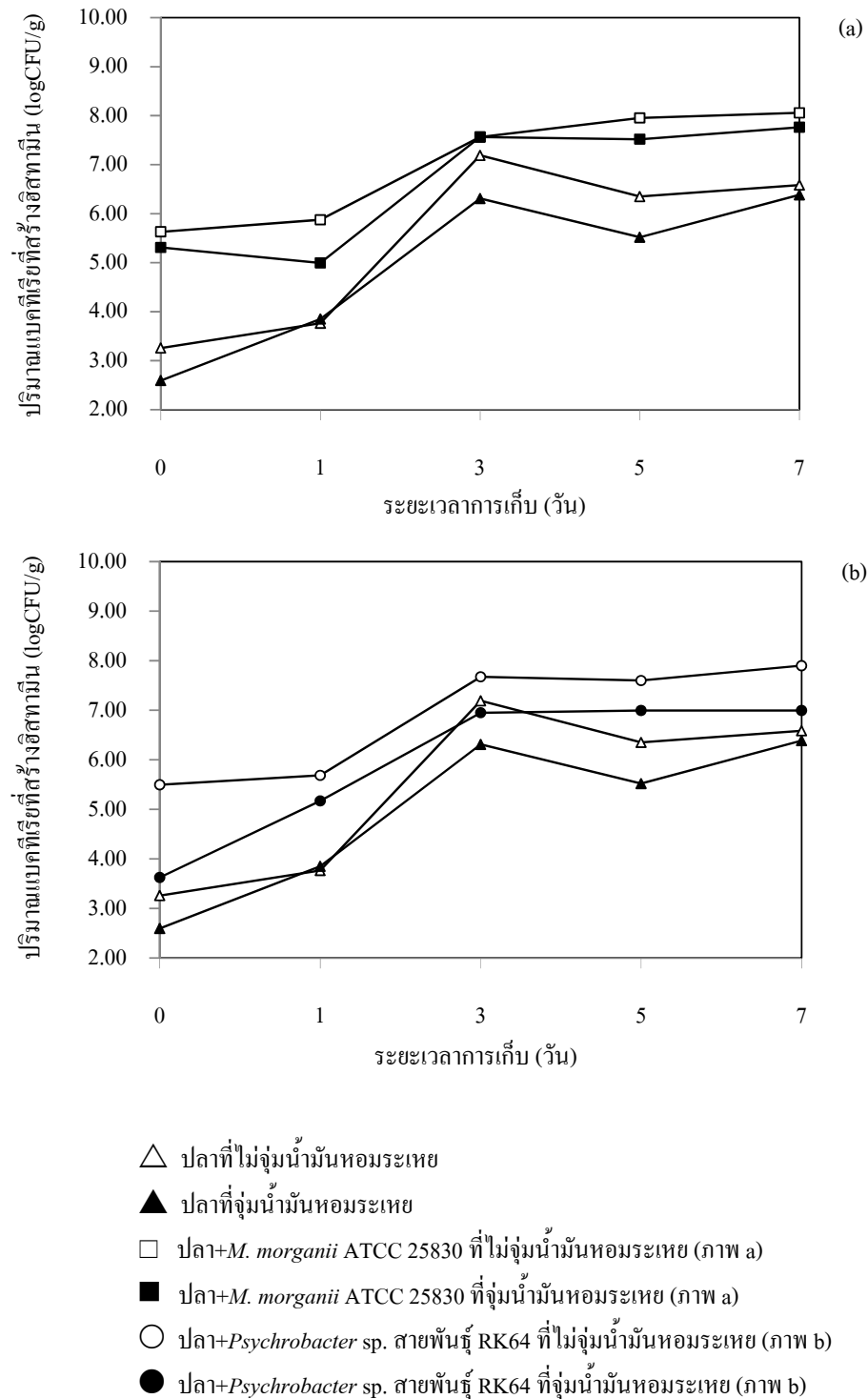
จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่ถูกเติมลงในปลาหูสดและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าในการทดลองเก็บรักษาปลาหูสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นในปลาหูสดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 20) โดยในตัวอย่างปลาหูสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย 0.8 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 9 ส่วนระยะเวลาการเก็บรักษาในวันที่ 11 ถึงวันที่ 15 พบว่าผลต่างของจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่จุ่มใน

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และชูดควบคุมมีค่าลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย 1.2 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชูดควบคุมตลอดช่วงระยะเวลา 15 วันที่เก็บรักษา ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย 0.5 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชูดควบคุมตลอดช่วงระยะเวลา 15 วันที่เก็บรักษา



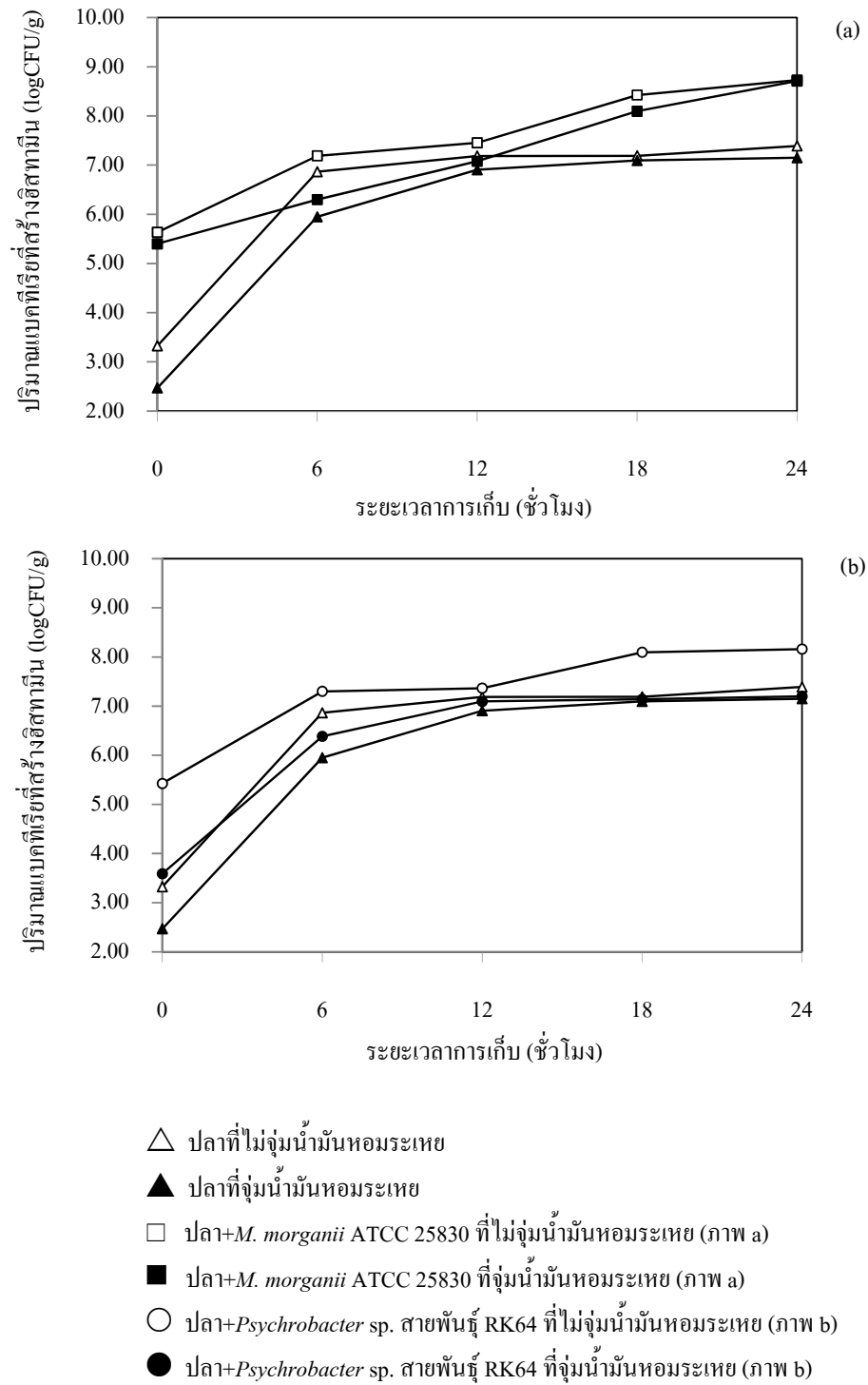
ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่สร้างอิซาทามีนในปลาทูสดที่มีน้ำมันหอมระเหย จากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในการทดลองเก็บรักษาปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นในปลาทุสดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 21) โดยในตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย 0.6 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ในวันแรกของการเก็บรักษา ส่วนระยะเวลาการเก็บรักษาในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 พบว่าผลต่างของจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และชุดควบคุมมีค่าลดลงจากวันแรกของการเก็บรักษาลงเหลือประมาณ 0.2 logCFU/g ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย 0.9 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุมตลอดช่วงระยะเวลา 7 วันที่เก็บรักษา ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย 0.8 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุม ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 5 ส่วนระยะเวลาการเก็บรักษาในวันที่ 7 พบว่าผลต่างของจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และชุดควบคุมมีค่าลดลงจากค่าเฉลี่ยวันแรกถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษาลงเหลือ 0.2 logCFU/g



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทูสคที่มีน้ำมันหอมระเหย จากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

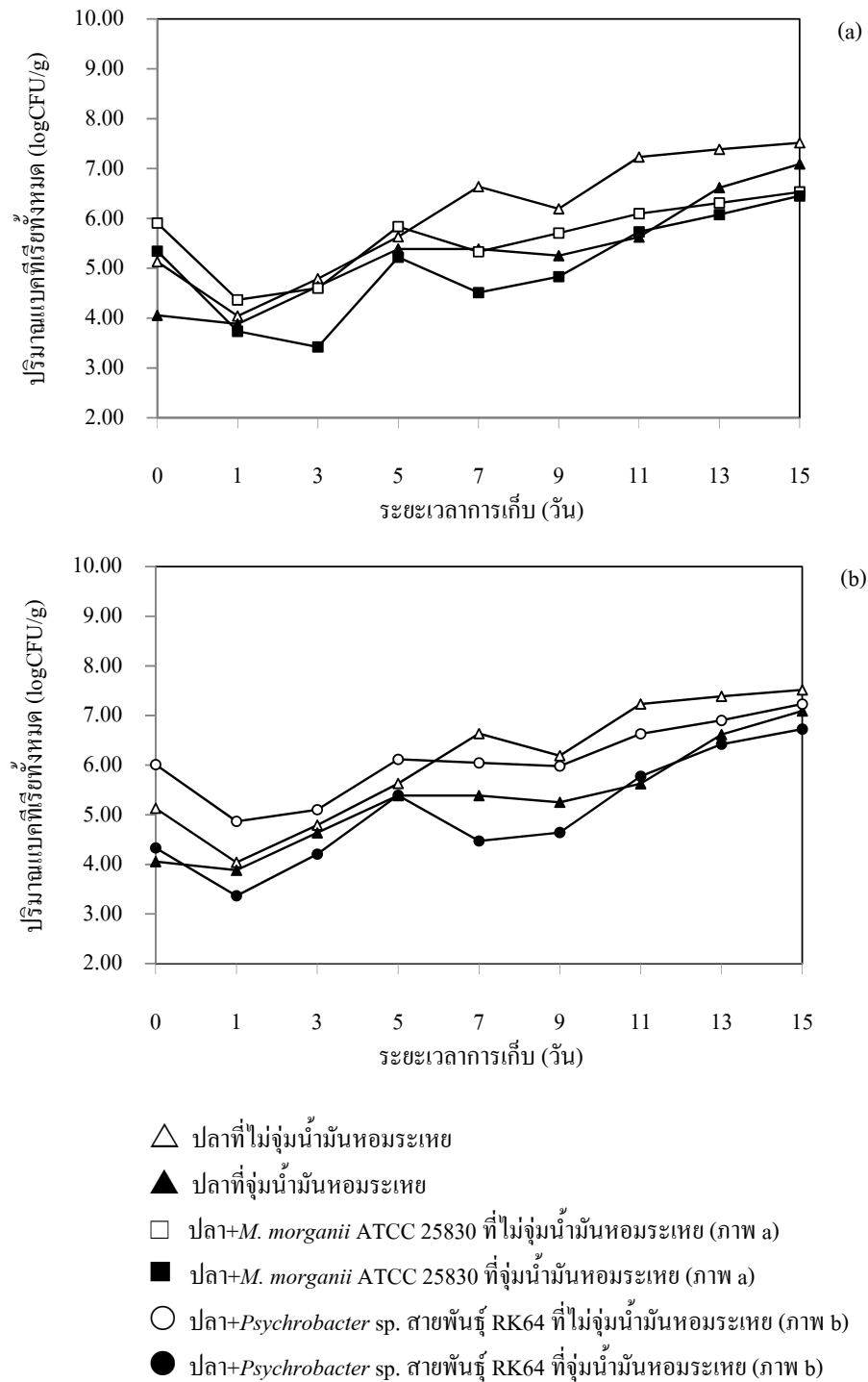
ในการทดลองเก็บรักษาปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นในปลาทุสดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 22) โดยในตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย $0.9 \log\text{CFU/g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ใน 6 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษา ส่วนในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่าผลต่างของจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และชุดควบคุมมีค่าลดลงจากค่าเฉลี่ยที่ 6 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาลงเหลือ $0.2 \log\text{CFU/g}$ ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย $1.0 \log\text{CFU/g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุมตลอดช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่เก็บรักษา ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างลงได้เฉลี่ย $0.9 \log\text{CFU/g}$ ใน 6 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษา ส่วนในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่าผลต่างของจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างอิสตามีนทั้งหมดที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และชุดควบคุมมีค่าลดลงจากค่าเฉลี่ยที่ 6 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาลงเหลือ $0.2 \log\text{CFU/g}$



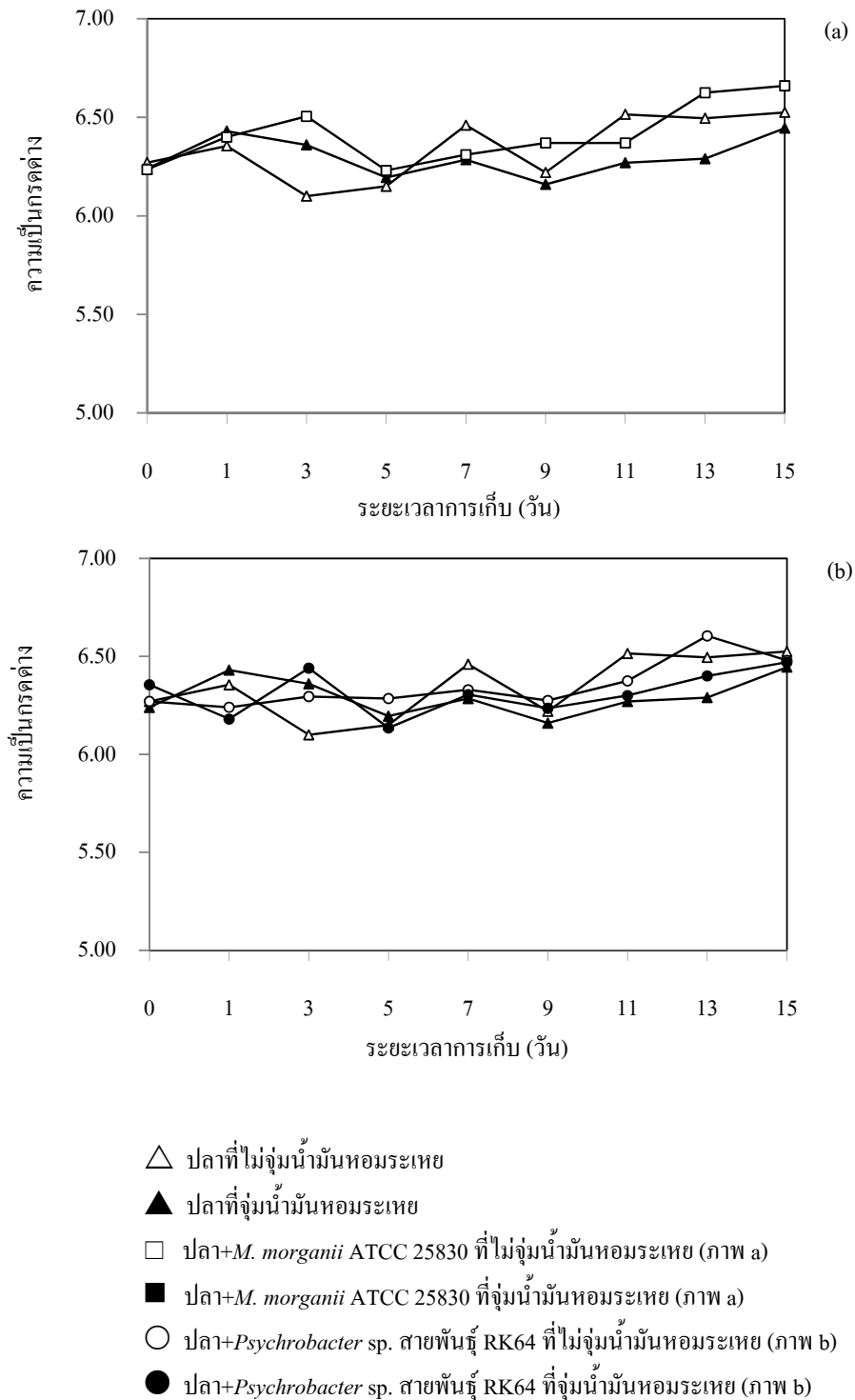
ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทูสคที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)

เมื่อพิจารณาอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ถูกกำหนดโดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของปลาสดทั้งตัวเยือกแข็ง (สมอ., 2529) ค่าความเป็นกรดต่างที่เปลี่ยนแปลงไป และการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า

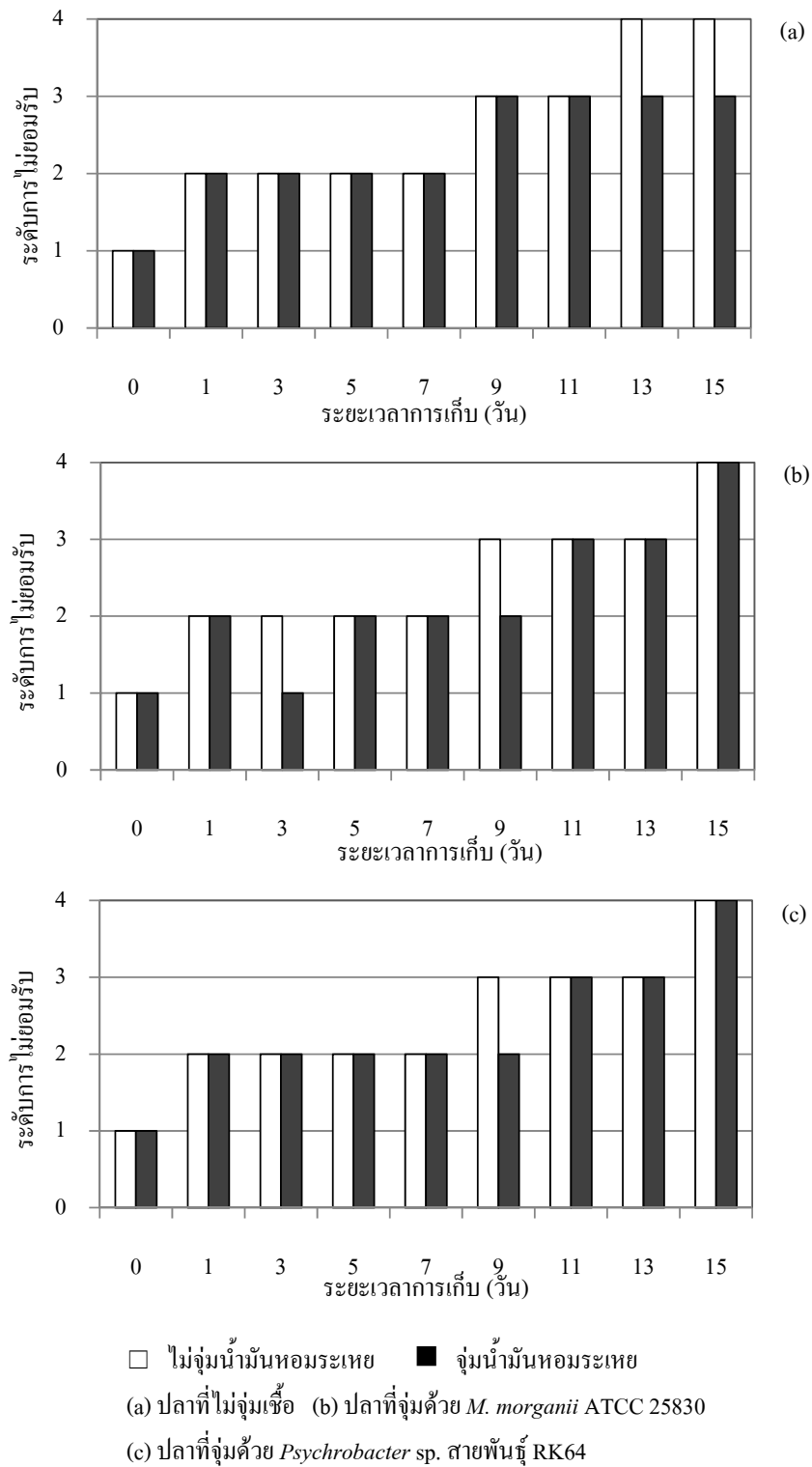
ในการทดลองเก็บรักษาปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ในปลาทุสดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 23) โดยตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830 มีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 15 วัน เช่นเดียวกับอายุการเก็บรักษาในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างได้นานขึ้น 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับอายุการเก็บรักษาของปลาทุสดในการทดลองชุดควบคุมซึ่งมีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 13 วัน ส่วนในตัวอย่างปลาทุสดที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างได้นานขึ้น 4 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับอายุการเก็บรักษาในการทดลองชุดควบคุมซึ่งมีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 9 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรดต่างของตัวอย่างปลาทุสด มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 24) ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 15 วัน ในปลาทุสดส่วนใหญ่ ซึ่งยกเว้นปลาทุสดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ร่วมกับการจุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และปลาทุสดที่ไม่ได้ถูกทำให้ปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์แต่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ โดยปลาทุสดดังกล่าวมีค่าความเป็นกรดต่างคงที่ ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ส่วนระดับการไม่ยอมรับของตัวอย่างปลาทุสดที่วิเคราะห์ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส มีระดับคะแนนอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ยอมรับในวันที่ 15 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปลาทูสคที่มีน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างในปลาทูสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

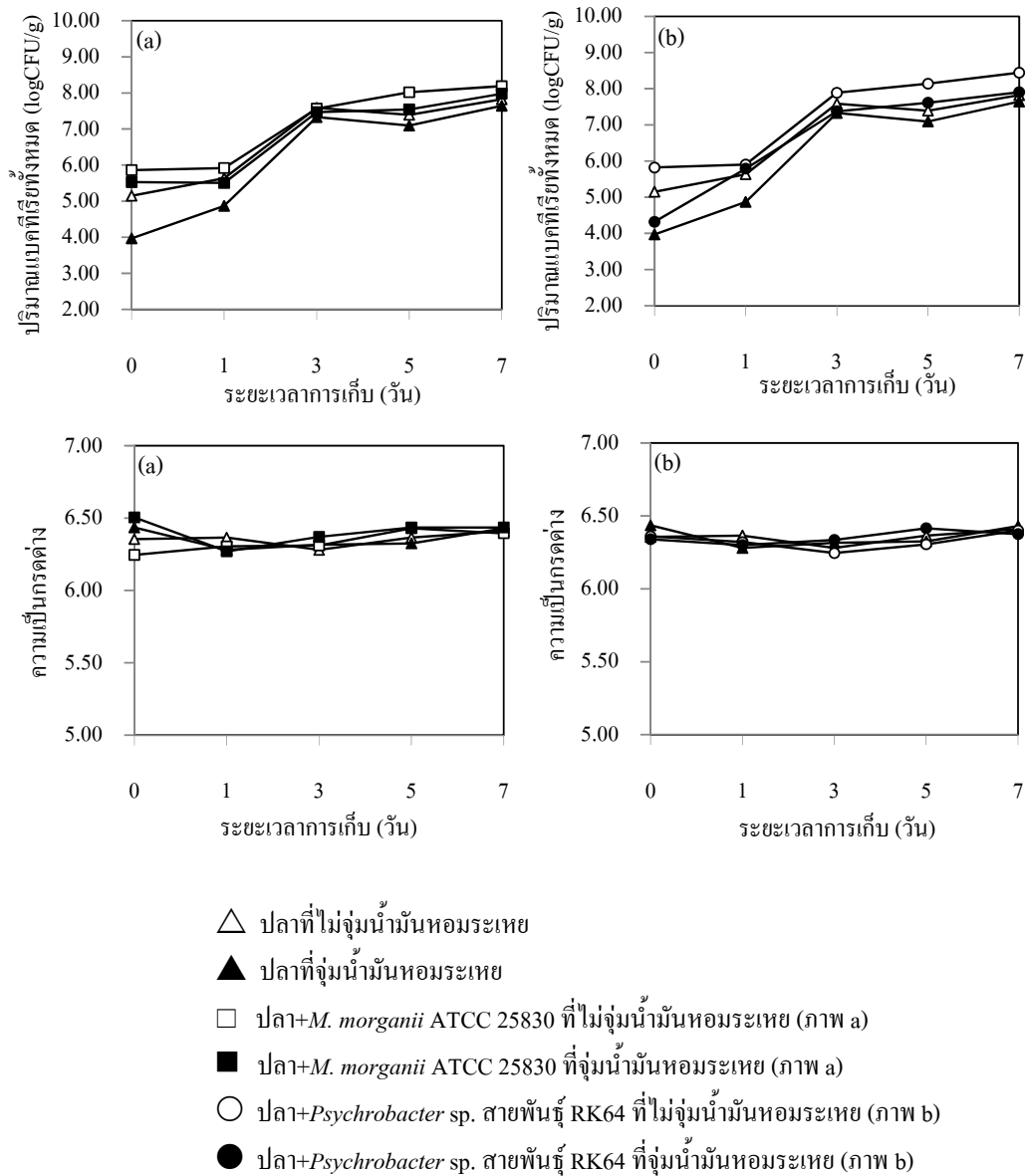


ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของระดับการไม่ยอมรับในปลาตู้สดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

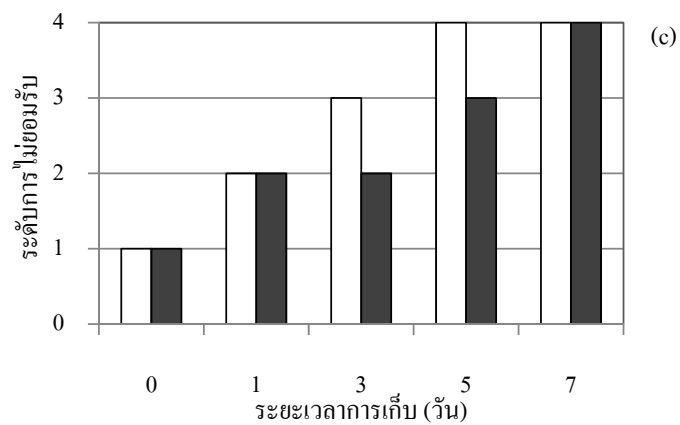
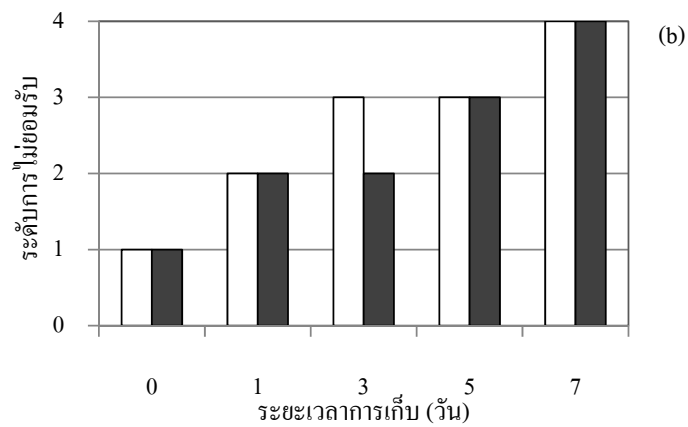
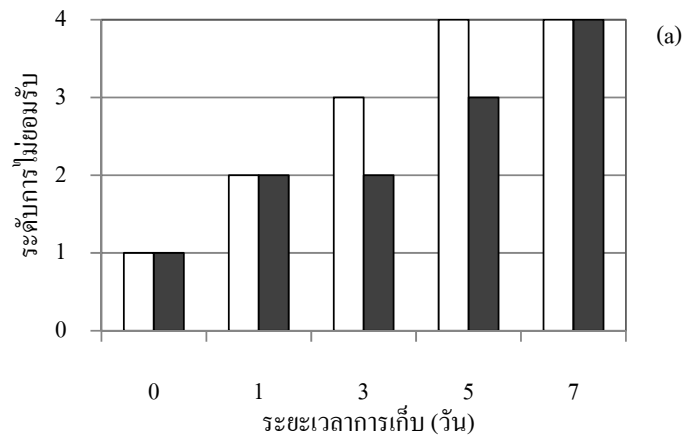
ในการทดลองเก็บรักษาปลาทูดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ในปลาทูดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 26) โดยตัวอย่างปลาทูดทั้งที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 1 วัน เนื่องจากมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเกินมาตรฐานกำหนด เช่นเดียวกับอายุการเก็บรักษาในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ แต่กลับพบว่าค่าความเป็นกรดต่างของปลาทูดมีแนวโน้มคงที่ ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน ในปลาทูดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 26) และระดับการไม่ยอมรับของตัวอย่างปลาทูดที่วิเคราะห์ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส มีระดับคะแนนอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ยอมรับในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 27)

ในการทดลองเก็บรักษาปลาทูดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ในปลาทูดทั้ง 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 28) โดยพบว่าตัวอย่างปลาทูดทั้งที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีอายุการเก็บรักษาเท่ากับ 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับอายุการเก็บรักษาในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ซึ่งมีอายุการเก็บรักษาเพียงชั่วโมงแรกของการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรดต่างของตัวอย่างปลาทูดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ร่วมกับการจุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และปลาทูดที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งที่มีการจุ่มและไม่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีแนวโน้มคงที่ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 28) โดยที่ปลาทูดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *M. morganii* ATCC 25830 ทั้งที่มีการจุ่มและไม่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และปลาทูดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 แต่ไม่จุ่มในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น แต่กลับพบว่าระดับการไม่ยอมรับของตัวอย่างปลาทูดที่

วิเคราะห์ที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส มีระดับคะแนนอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ยอมรับในชั่วโมงที่ 24 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและค่าความเป็นกรดต่างในปลาทูสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

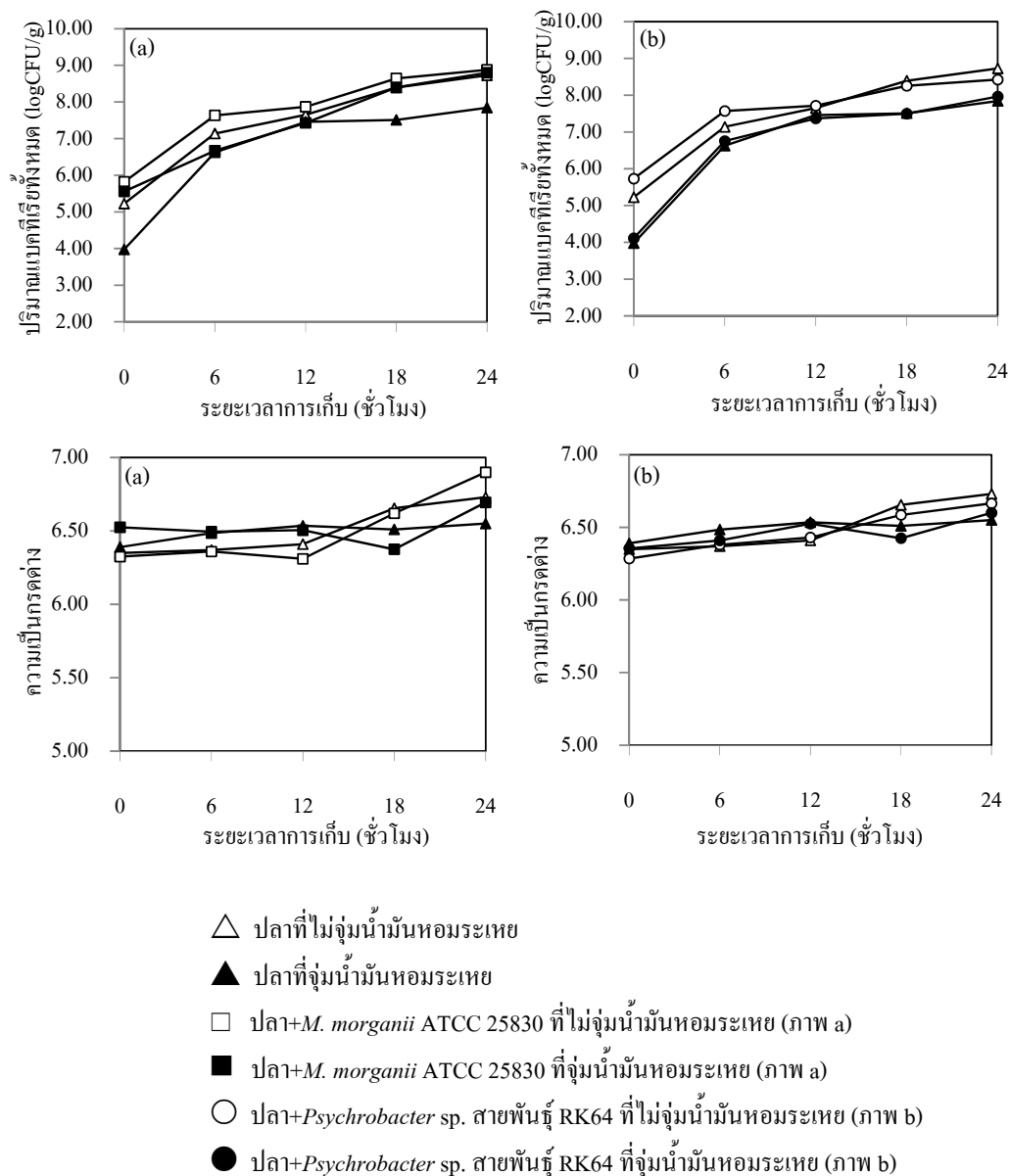


□ ไม่จุ่มน้ำมันหอมระเหย ■ จุ่มน้ำมันหอมระเหย

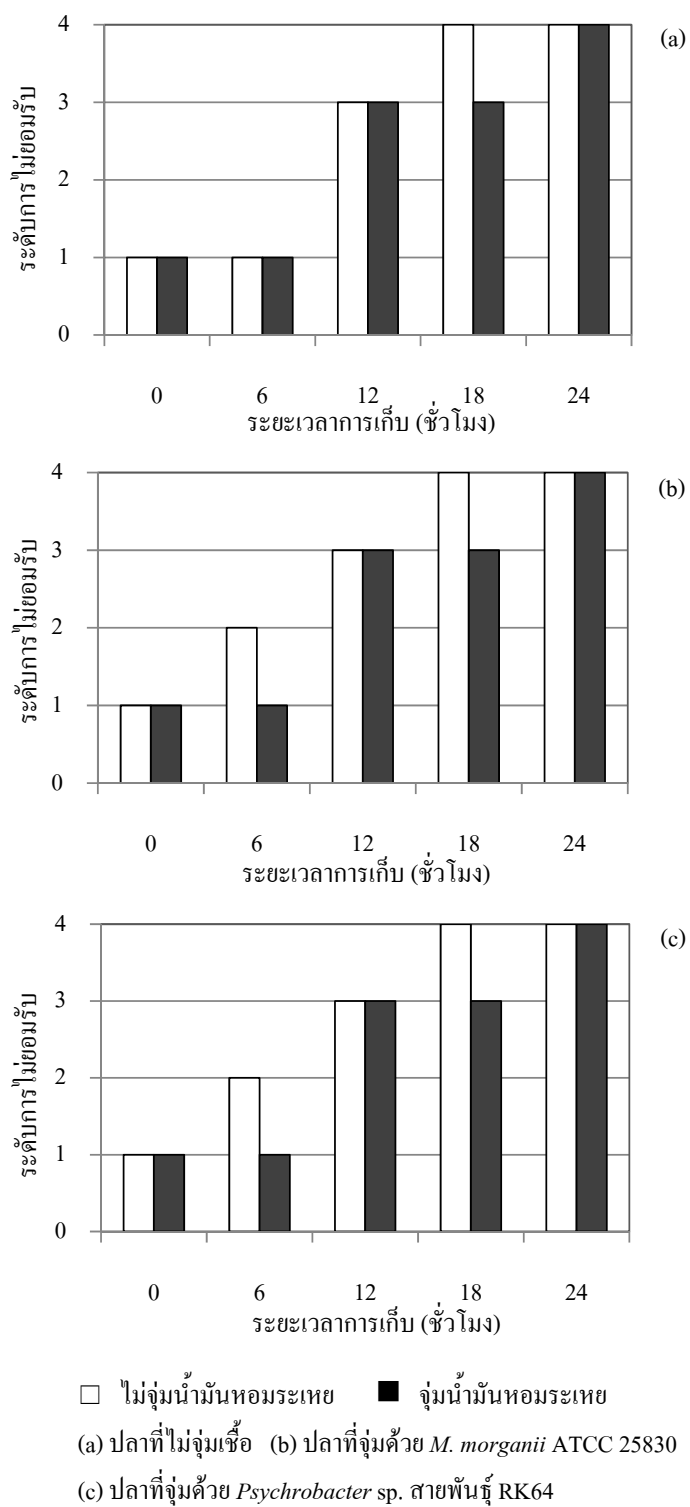
(a) ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ (b) ปลาที่จุ่มด้วย *M. morganii* ATCC 25830

(c) ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงของระดับการไม่ยอมรับในปลาทูสคที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและค่าความเป็นกรดต่างในปลาทูสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 29 การเปลี่ยนแปลงของระดับการไม่ยอมรับในปลาทูสคที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ เป็นสารต้านจุลชีพและเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส)

จากผลการทดลองเก็บปลาหูสดที่ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อนด้วย *M. morgani* ATCC 25830, *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 และที่ไม่ได้ถูกทำให้เกิดการปนเปื้อน โดยแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ไว้ในอุณหภูมิต่าง ๆ ทั้ง 3 อุณหภูมิ ทำให้สรุปได้ว่า การใช้สารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ มีผลในการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนทั้งหมดซึ่งพบในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา โดยการใช้ น้ำมันหอมระเหยร่วมกับอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) จะทำให้เก็บรักษาปลาหูสดได้นานที่สุด และเมื่อพิจารณาการเน่าเสียของปลาจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าไม่สอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบ กล่าวคือเมื่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบมีมากกว่าเกณฑ์กำหนดแล้ว แต่พบว่าผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ อีกทั้งค่าความเป็นกรดต่างก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งบอกการเสื่อมคุณภาพของตัวอย่างปลาหูได้ เนื่องจากมีแนวโน้มไม่แน่นอน

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนเริ่มต้นทั้งหมด ในปลาหูสดที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณสูงมาก อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนที่มีมาตั้งแต่แรก นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยบางส่วนที่มีการนำตัวอย่างอาหารมาทำให้ปลอดเชื้อก่อน แล้วจึงเติมหรือจุ่มด้วยแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ (Hsieh *et al.*, 2001; Mytle *et al.*, 2006) ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดมีค่าน้อย แต่งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจริง จึงเลือกใช้ตัวอย่างปลาจากแหล่งจำหน่ายจริงมาทำการทดสอบ ทำให้ผลที่ได้ นั้น มีความแตกต่างไม่ชัดเจนเหมือนการทดลองในห้องปฏิบัติการที่มีการฆ่าเชื้อและควบคุมปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้เป็นผลการทดลองในทางปฏิบัติ เพื่อการนำไปใช้จริง ที่ยังต้องมีการปรับปรุงทั้งในด้านของความเข้มข้นที่เหมาะสมแก่การยับยั้งการเจริญและสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่จะปนเปื้อนมาตามธรรมชาติ การคำนึงถึงคุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น กลิ่นตะไคร้ และลักษณะเนื้อสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไปจากการใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ รวมทั้งวิธีการใช้ที่ผู้ประกอบการจะสามารถทำได้ง่าย และช่วยให้ น้ำมันหอมระเหยมีการกระจายทั่วถึงและยึดเกาะกับอาหารได้นาน

นอกจากการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับอุณหภูมิต่ำ เพื่อลดปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งได้ดำเนินการในการทดลองนี้แล้ว ยังมีรายงานการวิจัยอื่นที่ใช้สารสกัดด้วย ethanol จากกานพลู กระวาน อบเชย และขมิ้นชัน เพื่อลดการสร้างฮิสตามีนของ *M. morgani* ในตัวอย่างปลาแมกเคอเรลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Shakila *et al.*, 1996) โดยพบว่าสารสกัดจากกานพลูและอบเชยมีผลยับยั้งการสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรียดังกล่าวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ

สารสกัดจากกระวานและขมิ้นชัน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ sodium chloride และ potassium sorbate ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการบรรจุแบบตัดแปลงบรรยากาศ (100% CO₂) สามารถลดการเจริญและสร้างอิสตามีนของ *M. morgani* ในเนื้อปลาแมกเคอเรลได้ (Aytac *et al.*, 2000)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนจากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้ทั้งหมด 166 ไอโซเลต ซึ่งมาจากปลา 73 ไอโซเลต ปลาอินทรี 50 ไอโซเลต และปลาโอลาย 43 ไอโซเลต หรือคิดเป็น 19.30% จากจำนวนโคโลนีที่สุ่มมาทดสอบทั้งหมด 860 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียทั้ง 166 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RK64 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้มากที่สุด เมื่อทำการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HE นอกจากนี้ผลของการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ RK64 โดยการศึกษาลำดับเบสของ 16s rDNA พบว่าสามารถจัดจำแนกได้เป็น *Psychrobacter* sp.

จากการทดสอบเบื้องต้น เพื่อคัดเลือกว่ามีน้ำมันหอมระเหยจำนวน 11 ชนิด และสารสกัดจากพืชพื้นบ้านจำนวน 15 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่สร้างฮิสตามีนจำนวน 2 สายพันธุ์คือ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ H15 รวมถึงแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนซึ่งคัดเลือกได้จากปลาในกลุ่มสคอมบรอยด์จำนวน 4 สายพันธุ์คือ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, แบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนสายพันธุ์ RK24, สายพันธุ์ RK32 และสายพันธุ์ RK37 พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย กะเพรา ตะไคร้ ใบพลู ใบมะกรูด ผลมะกรูด และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง กระถิน บัวบก แมงลัก ขมิ้น และลูกใต้ใบ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

ผลการทดสอบค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านต่อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 6 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรามีค่ากิจกรรมของสารต้านจุลชีพสูงสุดคือ 800-12,800 AU/ml รองลงมาคือ สารสกัดจากลูกใต้ใบ (200-6,400 AU/ml) น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (1,600-3,200 AU/ml) และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (100-1,600 AU/ml)

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีค่า MIC และ MBC ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลาย *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านจุลชีพชนิดอื่น โดยมีค่าเป็น 0.78, 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งและฆ่าทำลาย

M. morgani ATCC 25830 และมีค่าเป็น 0.14 และ 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งเชื้อ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ตามลำดับ

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบคือ ค่าความเป็นกรดค้างของอาหาร ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้จะยับยั้ง *M. morgani* ATCC 25830 ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดค้างเท่ากับ 5, 5.7, 8 และ 9 และยับยั้ง *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดค้างเท่ากับ 5, 5.7, 7, 8 และ 9 ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มอาหาร ปริมาณเกลือที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยในการลดปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในตัวอย่างปลาทูสัด โดยใช้ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ร่วมกับการเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ช่วยลดปริมาณของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาในทุกการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในชุดควบคุมที่ไม่มีการใช้ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ นอกจากนี้การเก็บรักษาปลาทูสัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสร่วมกับการใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ยังสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 15 วัน เมื่อพิจารณาจากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และการเก็บรักษาปลาทูสัดทั้ง 3 การทดลอง ที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ยังสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าการทดลองในชุดควบคุม 6 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทุกสายพันธุ์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่เป็นชนิดหลักซึ่งพบได้มากในปลาทู ปลาโอ และปลาโอลาย
2. ควรทำการวิเคราะห์ปริมาณสารฮิสตามีนด้วยวิธีการอื่นที่มีความแม่นยำและมีมาตรฐาน เช่นวิธี fluorometric method ซึ่งเป็นวิธีการที่รับรองโดย AOAC หรือวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค gas chromatography (GC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น

3. ควรทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่จะสามารถฆ่าทำลายแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้ทั้งหมดในระบบจำลองตัวอย่างอาหาร

4. ควรศึกษาถึงสถานะที่จะสามารถรักษาประสิทธิภาพและช่วยให้น้ำมันหอมระเหยกระจายทั่วถึง รวมทั้งช่วยให้ยึดเกาะกับอาหารได้เป็นระยะเวลาสั้น เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในอาหารจริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2549. การใช้ประโยชน์สัตว์น้ำเค็ม. สถิติการประมง. แหล่งที่มา: [http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2549/yearbook2006\(2549\)/t3.2.pdf](http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2549/yearbook2006(2549)/t3.2.pdf), 27 มีนาคม 2552.
- กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. 2552. การส่งออกสินค้าประมง. ข้อมูลการส่งออกสินค้าประมง. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/foreign/index.php?option=com_content&view=section&id=2&Itemid=32, 27 พฤษภาคม 2552.
- กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. 2552. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี. การตรวจวิเคราะห์สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/quality/standard_52.htm, 27 มีนาคม 2552.
- กองโภชนาการ. 2544. ตารางแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในอาหารไทย. กรมอนามัย. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.
- จริยา กุ์เจริญ. 2548. ผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาปลาหูและปลาซาร์ดีนสดต่อปริมาณฮีสตามีน. ใน การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2548. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- ดวงพร คันชโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.
- ทิวาพร พรหมรัตน์ และ วลัยรัตน์ จันทรปานนท์. 2549. การศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากมันชันและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, น. 250-257. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- นรีกุล สุระพัฒน์ และ อรษา สุตเธียรกุล. 2532. แอโรบิกแบซิลไลแกรมลบ 1-2, น. 84-105. ใน นรีกุล สุระพัฒน์, บรรณาธิการ. **จุลชีววิทยาทางการแพทย์**. ยูนิคัฟพับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.
- ปทุม อรุณวัชรินทร์, อากาศ สุภาพพัฒน์ และ จิตศิริ ราชตะนะพันธ์. 2550. การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย, น. 508-515. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พรรณิภา ชุมศรี. 2542. **สมุนไพรนาชาติ ตอนที่ 1**. โครงการวิจัยปลูกและรวบรวมพันธุ์พืชสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. **ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รัตนา อินทรานุกกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วาทีณี จตุรพรชัย. 2546. การสกัดและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย และ วลัยรัตน์ จันทรปานนท์. 2550. ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ของน้ำมันกานพลูทางการค้า, น. 719-725. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สร้อยญา วัชโรทัย. 2549. **พฤษเคมี**. เอกสารคำสอนวิชา 401561 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2529. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปลาสด
ทั้งตัวเยือกแข็ง. มอก. 617-2529.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนปลาร้า. มพช.
37/2546.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำปลาพื้นเมือง.
มพช. 673/2547.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2549. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนปลาเค็ม. มพช.
312/2549.

อุยามาส จริยวานุกุล. 2548. ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากข่าและกระเทียมในลูกชิ้นหมู.
วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 25: 151-161.

Attaran, R. R. and F. Probst. 2002. Histamine fish poisoning: a common but frequently
misdiagnosed condition. **Emerg. Med. J.** 19: 474-475.

Auerswald, L., C. Morren and A. L. Lopata. 2006. Histamine levels in seventeen species of fresh
and processed South African seafood. **Food Chem.** 98: 231-239.

Aytac, S. A., Z. Y. Ozbas and H. Vural. 2000. Effects of irradiation, antimicrobial agents and
modified-atmosphere packaging on histamine production by *Morganella morganii* in
mackerel fillets. **Arch. Lebensmittelhyg.** 51(1): 28-30.

Bagge-Ravn, D., Y. Ng, M. Hjelm, J. N. Christiansen, C. Johansen and L. Gram. 2003. The
microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the
microflora during processing and following cleaning and disinfection. **Int. J. Food
Microbiol.** 87: 239-250.

- Barbosa-Canovas, G. V. 1998. **Nonthermal Preservation of Foods**. Marcel Dekker, New York.
- Becker, K., K. Southwick, J. Reardon, R. Berg and J. N. MacCormack. 2001. Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. **J. Am. Med. Assoc.** 285(10): 1327-1330.
- Ben-Gigirey, B., J. M. V. Baptista de Sousa, T. G. Villa and J. Barros-Velazquez. 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). **J. Food Prot.** 62(8): 933-939.
- Borade, P. S., C. C. Ballary and D. K. C. Lee. 2007. A fishy cause of sudden near fatal hypotension. **Resuscitation** 72: 158-160.
- Brillantes, S. 1999. Histamine in fish sauce-health and safety considerations. **INFOFISH Int.** 4: 51-56.
- Burt, S. A. and R. D. Reinders. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. **Lett. Appl. Microbiol.** 36: 162-167.
- Chang, S., H. Kung, H. Chen, C. Lin and Y. Tsai. 2008. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. **Food Control** 19: 16-21.
- Chen, H. C., H. F. Kung, W. C. Chen, W. F. Lin, D. F. Hwang, Y. C. Lee and Y. H. Tsai. 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. **Food Chem.** 106: 612-618.
- Chomnawang, M. T., S. Surassmo, V. S. Nukoolkarn and W. Gritsanapan. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **J. Ethnopharmacol.** 101: 330-333.

- Chorianopoulos, N., E. Evergetis, A. Mallouchos, E. Kalpoutzakis, G. J. Nychas and S. A. Haroutounian. 2006. Characterization of the essential oil volatiles of *Saturaja thymbra* and *Satureja parnassica*: influence of harvesting time and antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem.** 54:3139-3145.
- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. D. Bruyne, N. Hermans, J. Totte, L. Pieters and A. J. Vlietinck. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the democratic republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.** 79: 213-220.
- Dabur, R., A. Gupta, T. K. Mandal, D. D. Singh, V. Bajpai, A. M. Gurav and G. S. Lavekar. 2007. Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants. **Afr. J. Trad. CAM.** 4(3): 313-318.
- Davis, J. and S. A. Henry. 2007. Scombroid fish poisoning associated with tuna steaks- Louisiana and Tennessee, 2006. **J. Am. Med. Assoc.** 298(11): 1269-1270.
- Eitenmiller, R. R., J. W. Wallis, J. H. Orr and R. D. Phillips. 1981. Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morgani*. **J. Food Prot.** 44(11): 815-820.
- Emborg, J., B. G. Laursen and P. Dalgaard. 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C-effect of vacuum and modified atmosphere packaging on psychrotolerant bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 101: 263-279.
- Emborg, J. and P. Dalgaard. 2006. Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. **J. Food Prot.** 69(4): 897-906.
- Feldman, K. A., S. B. Werner, S. Cronan, M. Hernandez, A. R. Horvath, C. S. Lee, A. M. Au and D. J. Vugia. 2005. A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating escolar fish (*Lepidocybium flavobrunneum*). **Epidemiol. Infect.** 133(1): 29-33.

- Fletcher, G. C., G. Summers and P. W. C. Veghel. 1998. Levels of histamine and histamine-producing bacteria in smoked fish from New Zealand markets. **J. Food Prot.** 61(8): 1064-1070.
- Gennari, M., S. Tomaselli and V. Cotrona. 1999. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. **Food Microbiol.** 16: 15-28.
- Hall, M. 2003. Something fishy: six patients with an unusual cause of food poisoning. **Emerg. Med.** 15: 293-295.
- Hardy, R. and J. G. M. Smith. 1976. The storage of mackerel (*Scomber scombrus*)-development of histamine and rancidity. **J. Sci. Food. Agric.** 27: 595-599.
- Hernandez-Herrero, M. M., A. X. Roig-Sagues, J. J. Rodriguez-Jerez and M. T. Mora-Ventura. 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). **J. Food Prot.** 62(5): 509-514.
- Hsieh, P. C., J. L. Mau and S. H. Huang. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiol.** 18: 35-43.
- Hsu, H. H., T. C. Chuang, H. C. Lin, Y. R. Huang, C. M. Lin, H. F. Kung and Y. H. Tsai. 2009. Histamine content and histamine-forming bacteria in dried milkfish (*Chanos chanos*) products. **Food Chem.** 14: 933-938.
- Hwang, S. J. and Y. M. Kim. 2005. Isolation and identification of a histamine-degrading bacteria from salted mackerel. **J. Life Sci.** 15(5): 743-748.
- Iscan, G., F. Demirci, M. Kurkcuoglu, M. Kivanc and K. H. C. Baser. 2003. The bioactive essential oil of *Heracleum sphondylium* L. subsp. *Ternatum* (Velen.) Brummitt. **Z. Naturforsch.** 58: 195-200.

- Jaisai, N. and S. Lamlerthton. 2007. Inhibition effects of Kaffir lime's peel oil on *Bacillus cereus* in cooked rice. **Naresuan University Journal** 15(3): 195-203.
- Jay, J. M., J. P. Vilai and M. E. Hughes. 2003. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7°C. **Int. J. Food Microbiol.** 81: 105-111.
- Kanki, M., T. Yoda, M. Ishibashi and T. Tsukamoto. 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. **Int. J. Food Microbiol.** 92: 79-87.
- Kerr, M., P. Lawicki, S. Aguirre and C. Rayner. 2002. **Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna.** Public Health Division, Victorian Government Department of Human Services, Werribee.
- Khatoun, S., V. Rai, A. K. S. Rawat and S. Mehrotra. 2006. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **J. Ethnopharmacol.** 104: 79-86.
- Kim, M. K., J. H. Mah and H. J. Hwang. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. **Food Chem.** 116: 87-95.
- Kim, M. W. and Y. M. Kim. 2006. Isolation and identification of histamine degrading bacteria from Kwamegi. **J. Life Sci.** 16(1): 120-125.
- Kim, S., B. Ben-Gigirey, J. Barros-Velazquez, R. J. Price and H. An. 2000. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. **J. Food Prot.** 63(2): 244-251.
- Kim, S., K. G. Field, M. T. Morrissey, R. J. Price, C. Wei and H. An. 2001. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. **J. Food Prot.** 64(7): 1035-1044.

- Kim, S. H., H. An and R. J. Price. 1999. Histamine formation and bacterial spoilage of albacore harvested of the U. S. northwest coast. **J. Food Sci.** 64(2): 340-343.
- Kimura, B., Y. Konagaya and T. Fujii. 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. **Int. J. Food Microbiol.** 70: 71-77.
- Kloucek, P., Z. Polesny, B. Svobodova, E. Vlkova and L. Kokoska. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria district. **J. Ethnopharmacol.** 99: 309-312.
- Kongpun, O. and P. Suwansakornkul. 2000. Histamine formation during salting of Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*). **J. Aquat. Food Prod. Technol.** 9(1): 21-30.
- Korashy, N. T. and H. El-S. M. Farag. 2005. Histamine and histamine producing bacteria in some local and imported fish and their public health significance. **Res. J. Agric. Biol. Sci.** 1(4): 329-336.
- Kosalec, I., S. Pepeljnjak and D. Kustrak. 2005. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella nisum* L., Apiaceae). **Acta Pharma.** 55: 377-385.
- Kose, S., P. Quantick and G. Hall. 2003. Changes in the levels of histamine during processing and storage of fish meal. **Anim. Feed Sci. Technol.** 107: 161-172.
- Koutsoumanis, K., K. Lambropoulou and G. J. E. Nychas. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **Int. J. Food Microbiol.** 49: 63-74.

- Krauze-Baranowska, M., K. Mardarowicz, M. Wiwart, L. Poblocka and M. Dynowska. 2002. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. **Z. Naturforsch.** 57: 478-482.
- Kuda, T., T. Mihara and T. Yano. 2007. Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nakazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. **Food Control** 18: 677-681.
- Laboratory Center for Food and Agricultural Products Company Limited. 2006. Histamine and amine intolerance. **LCFA Newsletter** 3(7): 14-21.
- Lehane, L. and J. Olley. 2000. Review: histamine fish poisoning revisited. **Int. J. Food Microbiol.** 58: 1-37.
- Lopez-Sabater, E., J. J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero, A. X. Roig-Sagues and M. T. Mora-Ventura. 1996a. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). **J. Food Prot.** 59(2): 167-174.
- Lopez-Sabater, E., J. J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero and M. T. Mora-Ventura. 1996b. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. **Int. J. Food Microbiol.** 28: 411-418.
- Loy, G., F. Cottiglia, D. Garau, D. Deidda, R. Pompei and L. Bonsignore. 2001. Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves. **Farmaco** 56: 433-436.
- Macan, J., R. Turk, J. Vukusic, D. Kipic and S. Milkovic-Kraus. 2006. Long-term follow-up of histamine levels in a stored fish meal sample. **Anim. Feed Sci. Technol.** 127: 169-174.
- Mah, J., H. Han, Y. Oh, M. Kim and H. Hwang. 2002. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. **Food Chem.** 79: 239-243.

- Marino, M., C. Bersani and G. Comi. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **Int. J. Food Microbiol.** 67:187-195.
- Mavromatis, P. and P. C. Quantick. 2002. Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. **J. Food Prot.** 65(3): 546-551.
- Mayr-Harting, A., A.J. Hedges and R.C.W. Berkeley. 1972. Method for studying bacteriocins, Vol. 7A, pp. 315-422. In T. Bergen and J.R. Norris, eds. **Methods in Microbiology**. Academic Press, Inc., London.
- McLauchlin, J., C. L. Little, K. A. Grant and V. Mithani. 2006. Scombrototoxic fish poisoning. **J. Public Health** 28(1): 61-62.
- Mejlholm, O. and P. Dalgaard. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 27-31.
- Messer, W. S. 2000. **Histamine synthesis**. MBC 3320 Histamine. Available Source: <http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/histamine.htm>, April 25, 2007.
- Miki, M., T. Ishikawa and H. Okayama. 2005. An outbreak of histamine poisoning after ingestion of the ground saury paste in eight patients taking isoniazid in tuberculous ward. **Internal Med.** 44(11): 1133-1136.
- Miladinovic, D. and L. J. Miladinovic. 2000. Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. **Physics, Chemistry and Technology** 2(2): 97-100.

- Morii, H. and K. Kasama. 2004. Activity of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations. **J. Food Prot.** 67(8): 1736-1742.
- Mytle, N., G. L. Anderson, M. P. Doyle and M. A. Smith. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control** 17: 102-107.
- Nanasombat, S. and P. Lohasupthawee. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. **KMITL Sci. Tech. J.** 5(3): 527-538.
- Nascimento, G. G. F., J. Locatelli, P. C. Freitas and G. L. Silva. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** 31: 247-256.
- Nawong, S., J. Yongsawatdigul and S. Rodtong. 2003. Isolation and identification of histamine-forming bacteria from anchovy, pp. 1-9. *In* **The 5th Agro-Industrial Conference**. Silpakorn University, Nakhon Pathom.
- Nimri, L. F., M. M. Meqdam and A. Alkofahi. 1999. Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. **Pharm. Biol.** 37(3): 196-201.
- Niven, C. F., M. B. Jeffrey and D. A. Corlett. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 41(1): 321-322.
- Nostro, A., M. P. Germano, V. D'Angelo, A. Marino and M. A. Cannatelli. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 379-384.

- Onawunmi, G. O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Lett. Appl. Microbiol.** 9: 105-108.
- Oussalah, M., S. Caillet, L. Saucier and M. Lacroix. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control** 18: 414-420.
- Patange, S. B., M. K. Mukundan and K. A. Kumar. 2005. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. **Food Control** 16: 465-472.
- Pattaratanawadee, E., C. Rachtanapun, P. Wanchaitanawong and W. Mahakarnchanakul. 2006. Antimicrobial activity of spice extracts against pathogenic and spoilage microorganisms. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 159-165.
- Periago, M. J., J. Rodrigo, G. Ros, J. J. Rodriguez-Jerez and M. Hernandez-Herrero. 2003. Monitoring volatile and nonvolatile amines in dried and salted roes of tuna (*Thunnus thynnus* L.) during manufacture and storage. **J. Food Prot.** 66: 335-340.
- Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar and S. Ignacimuthu. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complement. Altern. Med.** 6: 1-8.
- Prashanth, D., M. K. Asha and A. Amit. 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. **Fitoterapia** 72: 171-173.
- Predy, G., L. Honish, W. Hohm and S. Jones. 2003. Was it something she ate? Case report and discussion of scombroid poisoning. **Can. Med. Assoc. J.** 168(5): 587-588.

- Ringo, E., S. Sperstad, R. Myklebust, S. Refstie and A. Krogdahl. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) the effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. **Aquaculture** 261: 829-841.
- Rodtong, S., S. Nawong and J. Yongsawatdigul. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Microbiol.** 22: 475-482.
- Rossano, R., L. Mastrangelo, N. Ungaro and P. Riccio. 2006. Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): a study by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.** 830: 161-164.
- Saaid, M., B. Saad, N. H. Hashim, A. S. M. Ali and M. I. Saleh. 2009. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chem.** 113: 1356-1362.
- Sanceda, N. G., E. Suzuki, M. Ohashi and T. Kurata. 1999. Histamine behavior during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. **J. Agric. Food Chem.** 47: 3596-3600.
- Shakila, R. J., T. S. Vasundhara and D. V. Rao. 1996. Inhibitory effect of spices on in vitro histamine production and histidine decarboxylase activity of *Morganella morganii* and on the biogenic amine formation in mackerel stored at 30°C. **Z. Lebensm. Unts. Forsch.** 203: 71-76.
- Sikorski, Z. E., A. Kolakowska and J. R. Burt. 1990. Postharvest biochemical and microbial changes. In Z. E. Sikorski, eds. **Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation**. CRC Press, Inc., Florida.

- Singh, R., R. Chandra, M. Bose and P. M. Luthra. 2002. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Curr. Sci.** 83(6): 737-740.
- Singh, R. K. and G. Nath. 1998. Antimicrobial activity of *Elaeocarpus sphaericus*. **Phytother. Res.** 13(5): 448-450.
- Silva, C. C. G., D. J. B. Da-Ponte and M. L. N. Enes-Dapkevicius. 1998. Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. **J. Food Sci.** 63(4): 644-647.
- Sonboli, A., A. Fakhari, M. R. Kanani and M. Yousefzadi. 2004. Antimicrobial activity, essential oil composition and micromorphology of trichomes of *Satureja laxiflora* C. Koch from Iran. **Z. Naturforsch.** 59: 777-781.
- Specht, D. 1998. Scombroid fish poisoning. **J. Emerg. Nurs.** 24(2): 118-119.
- Srinivasan, D., S. Nathan, T. Suresh and P. L. Perumalsamy. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **J. Ethnopharmacol.** 74: 217-220.
- Stute, R., K. Petridis, H. Steinhart and G. Biernoth. 2002. Biogenic amines in fish and soy sauces. **Eur. Food Res. Technol.** 215: 101-107.
- Sumner, S. S. and S. L. Taylor. 1989. Detection method for histamine-producing, dairy-related bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. **J. Food Prot.** 52(2): 105-108.
- Suppakul, P., N. Sanla-Ead and P. Phoopuritham. 2006. Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 91-100.
- Taylor, S. L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit. Rev. Toxicol.** 17(2): 91-128.

- Taylor, S. L., L. S. Guthertz., M. Leatherwood and E. R. Lieber. 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. **Appl. Environ. Microbiol.** 37(2): 274-278.
- Thongson, C. 2005. **Antimicrobial Activity of Thai Spices Against Foodborne Pathogens.** Ph. D. Thesis, Kasetsart University.
- Tolulope, O. M. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. **J. Med. Plant Res.** 1(1): 9-13.
- Torres, S., M. Roeckel and M. C. Marti. 2002. Histamine formation by *Morganella morganii* isolated from *Trachurus murphyi* (Chilean mackerel). **Lat. Am. Appl. Res.** 32(2): 205-208.
- Tsai, Y., C. Lin, L. Chien, T. Lee, C. Wei and D. Hwang. 2006. Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. **Food Chem.** 98(1): 64-70.
- Tsai, Y., C. Lin, S. Chang, H. Chen, H. Kung, C. Wei and D. Hwang. 2005a. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. **Food Microbiol.** 22: 461-467.
- Tsai, Y., H. Kung, H. Chen, S. Chang, H. Hsu and C. Wei. 2007. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in dried milkfish (*Chanos chanos*) implicated in a food-borne poisoning. **Food Chem.** 105: 1289-1296.
- Tsai, Y., H. Kung, T. Lee, G. Lin and D. Hwang. 2004. Histamine-related hygienic qualities and bacteria found in popular commercial scombroid fish fillets in Taiwan. **J. Food Prot.** 67(2): 407-412.

- Tsai, Y., H. Kung, T. Lee, H. Chen, S. Chou, C. Wei and D. Hwang. 2005b. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. **Food Control** 16: 579-585.
- Voravuthikunchai, S., A. Lortheeranuwat, W. Jeeju, T. Sririrak, S. Phongpaichit and T. Supawita. 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **J. Ethnopharmacol.** 94: 49-54.
- Vukovic, N., T. Milosevic, S. Sukdolak and S. Solujic. 2007. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 4: 17-20.
- Wei, C. I., C. M. Chen, J. A. Koburger, W. S. Otwell and M. R. Marshall. 1990. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. **J. Food Sci.** 55(1): 59-63.
- Wei, L. S., N. Musa, C. T. Sengm, W. Wee and N. A. M. Shazili. 2008. Antimicrobial properties of tropical plants against 12 pathogenic bacteria isolated from aquatic organisms. **Afr. J. Biotechnol.** 7(13): 2275-2278.
- Yano, Y., M. Satomi and H. Oikawa. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. **Int. J. Food Microbiol.** 111: 6-11.
- Yeh, C., S. Lin and D. Hwang. 2006. Biogenic amines, histamine and label of dressed fried fish meat products in Taiwan. **Food Control** 17: 423-428.
- Yongsawatdigul, J., Y. J. Choi and S. Udornporn. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **J. Food Sci.** 69(4): 312-319.
- Zampini, I. C., M. A. Vattuone and M. I. Isla. 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. **J. Ethnopharmacol.** 102: 450-456.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. modified Niven's medium (Kim *et al.*, 2001)

glucose	0.5	%
yeast extract	0.5	%
sodium chloride	0.5	%
tryptone	0.5	%
calcium carbonate	0.1	%
L-histidine monohydrochloride monohydrate	1	%
ผงวุ้น	2	%
bromocresol purple	0.006	%

ปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 5.7 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีม่วงอมแดง

2. Fish juice extract (Taylor *et al.*, 1979)

ปั่นเนื้อปลาทุสดีให้ละเอียดในน้ำปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักเนื้อปลา นำไปนึ่งด้วยไอน้ำ นาน 1 ชั่วโมง นำออกมารองเอาแต่น้ำ แล้วเติมส่วนประกอบอื่น ๆ ดังนี้

glucose	0.1	%
bromocresol purple	0.002	%

ปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 5.7 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีม่วงอมแดง

3. Histamine evaluation broth (Kim *et al.*, 2001)

tryptone	0.5	%
sodium chloride	0.5	%
dipotassium phosphate	0.25	%
L-histidine monohydrochloride monohydrate	1	%

bromocresol purple

0.002 %

ปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 5.7 แล้วนำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีม่วงอมแดง

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์สารฮิสตามีน

1. การวิเคราะห์สารฮิสตามีนด้วยวิธี colorimetric method (Hardy and Smith, 1976)

1.1 สารเคมีที่ใช้

- 1.1.1 สารละลายกรด 2.5% trichloroacetic acid
- 1.1.2 สารละลายต่าง 1 M potassium hydroxide
- 1.1.3 Amberlite Resin (CG-50)
- 1.1.4 สารละลายบัฟเฟอร์ เตรียมโดยผสม 0.2 M acetic acid กับสารละลาย 0.2 M sodium acetate ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ซึ่งจะได้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.63
- 1.1.5 สารละลาย 0.2 M hydrochloride
- 1.1.6 สารละลาย 5% sodium carbonate
- 1.1.7 สาร *p*-bromoaniline
- 1.1.8 สารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น
- 1.1.9 สารละลาย 5% sodium nitrite
- 1.1.10 สาร histamine dihydrochloride

1.2 การเตรียมสารเคมี

1.2.1 สารละลาย diazotizing เตรียมโดยละลาย *p*-bromoaniline 0.894 กรัม ด้วย hydrochloric acid เข้มข้น 9 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งจน *p*-bromoaniline ละลายหมด ปิเปตสารละลายมา 2 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตรที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมสารละลาย 5% sodium nitrite ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ที่แช่เย็นประมาณ 0 องศาเซลเซียส) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 5% sodium nitrite ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะใช้ได้หลังจากปล่อยให้เสถียรเป็นเวลา 15 นาที และควรรู้ภายใน 12 ชั่วโมง

1.2.2 สารละลายฮิสตามีนมาตรฐาน เตรียมสารละลายฮิสตามีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (โดยละลาย histamine dihydrochloride 16.58 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปิเปตมา 2, 4, 6, 8 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย 0.2 M hydrochloric acid สารละลายนี้จะมีค่าความเข้มข้นของฮิสตามีนเป็น 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

1.3 การเตรียมตัวอย่าง

1.3.1 สำหรับตัวอย่างเนื้อปลา เตรียมตัวอย่างโดยสับเนื้อปลาให้ละเอียด แล้วปั่นเนื้อปลาหนัก 10 กรัม กับ 2.5% trichloroacetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง ให้ได้สารละลายส่วนใส

1.3.2 สำหรับตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมตัวอย่างโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว ไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรด 2.5% trichloroacetic acid 100 มิลลิลิตร

1.4 การแยกฮิสทามีนจากสารละลายตัวอย่าง

1.4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผสมกับสารละลาย trichloroacetic acid แล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7 ด้วยสารละลายต่าง 1 M potassium hydroxide

1.4.2 ชั่งเรซิน 1 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร แล้วบรรจุใส่คอลัมน์ ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 12 มิลลิเมตร แล้วล้างเรซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิมอีก 150 มิลลิลิตร

1.4.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างแล้วผ่านเรซิน

1.4.4 ล้างเรซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 150 มิลลิลิตร

1.4.5 ชะฮิสทามีนด้วยสารละลาย 0.2 M hydrochloric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1.4.6 ทำ blank โดยปฏิบัติตามข้อ 1.4.1-1.4.5 แต่ใช้ 2.5% trichloroacetic acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

1.5 การทำให้เกิดสี

1.5.1 ปิเปตสารละลาย 5% sodium carbonate ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดจุกแก้วที่เช็ดในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมตัวอย่างที่ได้จากการชะฮิสทามีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.5.2 หลังจากนั้นเติมสารละลาย diazotizing ที่เตรียมไว้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1.5.3 เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าความเข้มสี (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น reference (ต้องวัดหลังจากผสมแล้ว 10 นาที และห้ามเกิน 20 นาที cuvette ที่ใช้ต้องเช็ดให้แห้งก่อนวัด)

1.6 การทำกราฟมาตรฐาน

1.6.1 ทำตามวิธีการทำให้เกิดสีโดยใช้สารละลายฮิสทามีนมาตรฐาน 4 ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง

1.6.2 plot graph โดยใช้ความเข้มข้นของฮิสทามีนเป็นแกน X และค่า absorbance เป็นแกน Y

1.7 การคำนวณ

ปริมาณฮิสทามีน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) = $\frac{H(1000 + M)}{40V}$

40V

เมื่อ H = ความเข้มข้นของฮิสทามีนเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

M = เปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างที่วิเคราะห์

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (25 มิลลิลิตร)

2. การวิเคราะห์สารฮิสตามีนด้วยวิธี enzymatic histamine analysis method (Kim *et al.*, 2001)

2.1 สารเคมีที่ใช้และการเตรียม

2.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ โดยเตรียมจากสารละลายของ 0.075 M potassium dihydrogen phosphate ผสมกับ 0.075 M disodium hydrogen phosphate ซึ่งจะได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดค่าเท่ากับ 6.8

2.1.2 เอนไซม์ diamine oxidase ละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.35 u/ml

2.1.3 เอนไซม์ horse radish peroxidase ละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 17.5 u/ml

2.1.4 สารละลาย leucocrystal violet ละลายในสารละลาย 0.5% hydrochloric acid ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีน

2.2.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเชื้อแล้ว ไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ใช้วิเคราะห์

2.2.2 ปิเปตส่วนใสปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตรของ 0.15 M phosphate buffer, 0.5 มิลลิลิตรของ diamine oxidase, 0.5 มิลลิลิตรของ peroxidase และ 0.1 มิลลิลิตรของ leucocrystal violet ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.3 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 596 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายฮิสตามีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3-30 ppm และใช้ blank เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ HE ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ค

การตรวจสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสของปลาหูสด

ตารางผนวกที่ ๑๑ การจำแนกระดับการไม่ยอมรับของตัวอย่างปลาหูสดโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส

อวัยวะ ของปลา	ระดับการไม่ยอมรับ			
	1	2	3	4
ผิวหนัง	เป็นมันเงา ปรากฏสไต เก็ด หลุดร่วงน้อย	เป็นประกาย เก็ดหลุดร่วงมาก	เป็นประกายปานกลาง	ลักษณะขุ่น มีเมือกเหลือง
ตา	ม่านตาสีดำเป็นประกาย บริเวณ กระจกตาใส	เยื่อตานั้นเป็นสีเลือด กระจกตา ขุ่น เยื่อตาขุ่นจม	ม่านตาขุ่น เป็นสีเทา บริเวณ รอบๆ เป็นสีน้ำตาลแดง	ตางมลงในส่วนหัว
เหงือก	มีสีแดงของเลือด มีกลิ่นสดตาม ธรรมชาติ	มีสีแดงคล้ำ มีกลิ่นคาวปลา เล็กน้อย	สีน้ำตาลแดง มีกลิ่นคาวปลา รุนแรง มีลักษณะเขียว และเลือด น้อย	เขียวขุ่น มีกลิ่นแอมโมเนีย กลิ่น เสียเหม็นเน่ารุนแรง และมีเมือก เหลือง
ลักษณะเนื้อ สัมผัส	แน่นแข็งจากการเกร็งตัวของ กล้ามเนื้อ	ความแน่นแข็งลดลง ไม่ยืดหยุ่น	นุ่ม ไม่แน่นแข็ง อาจมองเห็น กระดูกบริเวณซี่โครง ท้องบวม เล็กน้อย	นิ่ม บริเวณท้องแตกหรือบวม มาก มีกลิ่นเหม็นเน่าบริเวณช่อง ท้อง

ที่มา: ดัดแปลงจาก จริยา (2548)

ภาคผนวก ง
ตารางผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ๑1 สัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่คัดเลือกได้
และค่าความเป็นกรดต่างที่สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FJ และ HEB

ไอโซ เลต	การติดสี แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียง เซลล์	การจัด กลุ่ม	การสร้างเอนไซม์		ค่าความเป็นกรดต่าง	
					ออกซิเดส	คะตะเลส	FJ	HEB
ปลาอินทรี								
SC1	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.03±0.01	5.76±0.02
SC2	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.17±0.01	5.77±0.01
SC3	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.74±0.52	5.82±0.01
SC4	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.01	5.77±0.02
SC5	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.77±0.01
SC6	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.10±0.01	5.78±0.01
SC7	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.06±0.01	5.77±0.02
SC8	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.05±0.01	5.76±0.01
SC9	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.09±0.01	5.76±0.01
SC10	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.76±0.01
SC11	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.00	5.79±0.01
SC11	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.19±0.03	5.76±0.01
SC12	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.04±0.01	5.76±0.00
SC13	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.05±0.01	5.77±0.00
SC14	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.09±0.01	5.77±0.01
SC15	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.16±0.03	5.72±0.04
SC16	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.01	5.76±0.01
SC17	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.00±0.01	5.77±0.02
SC18	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.01±0.00	5.76±0.01
SC19	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.06±0.00	5.74±0.01
SC20	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.10±0.02	5.78±0.01
SC21	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.02	5.77±0.02
SC22	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.01±0.01	5.76±0.02
SC23	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.99±0.01	5.75±0.04
SC24	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.01±0.01	5.74±0.02
SC25	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.01	5.74±0.01
SC26	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.01±0.01	5.78±0.01
SC27	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.00±0.02	5.77±0.02

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

ไอโซ เลต	การติดสี แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียง เซลล์	การจัด กลุ่ม	การสร้างเอนไซม์		ค่าความเป็นกรดด่าง	
					ออกซิเดส	คะตะเลส	FJ	HEB
SC28	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.00	5.79±0.01
SC29	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.05±0.02	5.83±0.01
SC30	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.01±0.01	5.76±0.01
SC31	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.01	5.76±0.02
SC32	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.01	5.78±0.02
SC33	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.02	5.77±0.02
SC34	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.76±0.03
SC35	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.04±0.01	5.78±0.01
SC36	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.10±0.01	5.75±0.01
SC37	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.76±0.01
SC38	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.10±0.01	5.76±0.02
SC39	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.00	5.78±0.02
SC40	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.03±0.01	5.77±0.02
SC41	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.03±0.01	5.76±0.03
SC42	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.05±0.02	5.78±0.01
SC43	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.06±0.01	5.75±0.01
SC44	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.00±0.00	5.76±0.01
SC45	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.99±0.01	5.76±0.02
SC46	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.01	5.78±0.02
SC47	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.05±0.02	5.83±0.01
SC48	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.01±0.01	5.76±0.01
SC49	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.01	5.76±0.02
SC50	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.01	5.78±0.02
ปลาทุ								
RK1	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.10±0.01	5.76±0.01
RK2	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.10±0.01	5.73±0.03
RK3	-	ท่อน	เดี่ยว	II	+	+	6.07±0.01	5.75±0.02
RK4	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.98±0.00	5.63±0.02
RK5	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.97±0.00	5.72±0.03
RK6	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.12±0.01	5.75±0.02
RK7	-	ท่อน	เดี่ยว	II	+	+	5.93±0.01	5.67±0.01

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

ไอโซ เลต	การติดสี แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียง เซลล์	การจัด กลุ่ม	การสร้างเอนไซม์		ค่าความเป็นกรดต่าง	
					ออกซิเดส	คะตะเลส	FJ	HEB
RK8	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.04	5.74±0.03
RK9	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.01±0.01	5.71±0.03
RK10	-	ท่อน	เดี่ยว	III	-	+	5.93±0.00	5.65±0.00
RK11	-	ท่อน	เดี่ยว	III	-	+	6.12±0.02	5.81±0.02
RK12	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.99±0.00	5.69±0.01
RK13	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.93±0.01	5.69±0.01
RK14	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.11±0.01	5.63±0.00
RK15	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.97±0.01	5.63±0.01
RK16	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	V	+	-	6.01±0.01	5.84±0.01
RK17	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.25±0.01	5.65±0.01
RK18	-	ท่อน	เดี่ยว	II	+	+	6.12±0.01	5.64±0.01
RK19	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.95±0.01	5.71±0.01
RK20	-	ท่อน	เดี่ยว	VI	-	-	6.39±0.01	5.78±0.02
RK21	-	ท่อน	เดี่ยว	VI	-	-	6.00±0.01	5.80±0.01
RK22	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.09±0.03	5.67±0.01
RK23	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.15±0.03	5.72±0.01
RK24	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VII	-	-	6.37±0.00	5.77±0.06
RK25	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.22±0.02	5.78±0.01
RK26	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	IV	+	+	5.95±0.02	5.77±0.01
RK27	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.98±0.00	5.66±0.01
RK28	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.94±0.01	5.69±0.06
RK29	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.03	5.73±0.07
RK30	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.99±0.00	5.66±0.01
RK31	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.16±0.01	5.70±0.07
RK32	-	ท่อนสั้น	คู่	VIII	-	+	6.20±0.02	5.73±0.01
RK33	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.69±0.04	5.76±0.03
RK34	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.80±0.02	5.71±0.01
RK35	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.88±0.05	5.71±0.01
RK36	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.14±0.01	5.70±0.01
RK37	-	ท่อน	เดี่ยว	II	+	+	6.13±0.03	5.70±0.01

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

ไอโซ เลต	การติดสี แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียง เซลล์	การจัด กลุ่ม	การสร้างเอนไซม์		ค่าความเป็นกรดต่าง	
					ออกซิเดส	คะตะเลส	FJ	HEB
RK38	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	IV	+	+	6.00±0.01	5.74±0.04
RK39	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	IV	+	+	5.98±0.00	5.72±0.04
RK40	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.97±0.01	5.71±0.07
RK41	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.21±0.01	5.66±0.03
RK42	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.60±0.03	5.71±0.07
RK43	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.98±0.01	5.69±0.05
RK44	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.98±0.01	5.81±0.02
RK45	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.99±0.01	5.81±0.02
RK46	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.95±0.01	5.81±0.02
RK47	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.95±0.01	5.80±0.03
RK48	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.96±0.02	5.80±0.02
RK49	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.90±0.03	5.80±0.01
RK50	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.00±0.05	5.84±0.02
RK51	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.90±0.09	5.81±0.00
RK52	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.03	5.84±0.02
RK53	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.95±0.01	5.83±0.01
RK54	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.01	5.85±0.02
RK55	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.04±0.03	5.84±0.01
RK56	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.02	5.83±0.02
RK57	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.00±0.01	5.84±0.01
RK58	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.89±0.04	5.85±0.02
RK59	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.95±0.01	5.85±0.01
RK60	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.13±0.01	6.52±0.01
RK61	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.04±0.00	6.19±0.24
RK62	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.00±0.01	6.07±0.28
RK63	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.04±0.01	6.04±0.35
RK64	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.17±0.03	6.22±0.30
RK65	-	ท่อนสั้น	สาย	IX	+	+	5.93±0.00	6.44±0.02
RK66	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.23±0.02	5.83±0.01
RK67	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.92±0.01	6.20±0.26

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

ไอโซ เลข	การติดสี แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียง เซลล์	การจัด กลุ่ม	การสร้างเอนไซม์		ค่าความเป็นกรดต่าง	
					ออกซิเดส	คะตะเลส	FJ	HEB
RK68	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.84±0.01	5.91±0.03
RK69	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	IV	+	+	5.96±0.01	6.65±0.02
RK70	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.93±0.00	5.81±0.01
RK71	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.95±0.00	5.81±0.04
RK72	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.28±0.08	5.76±0.06
RK73	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.94±0.01	5.85±0.01
ปลาโอ								
EA1	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.94±0.00	5.79±0.05
EA2	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.11±0.01	5.75±0.01
EA3	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.03	5.85±0.05
EA4	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.97±0.00	5.82±0.04
EA5	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.98±0.01	5.85±0.00
EA6	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.43±0.02	5.80±0.03
EA7	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.12±0.02	5.84±0.01
EA8	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.13±0.01	5.83±0.01
EA9	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.82±0.02
EA10	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.16±0.01	5.74±0.04
EA11	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.13±0.01	5.84±0.00
EA12	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.07±0.04	5.82±0.00
EA13	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.27±0.03	5.82±0.01
EA14	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.26±0.02	5.80±0.03
EA15	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.16±0.01	5.78±0.02
EA16	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.82±0.01
EA17	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.27±0.02	5.82±0.01
EA18	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.11±0.04	5.82±0.01
EA19	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.07±0.01	5.84±0.01
EA20	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.21±0.03	5.82±0.01
EA21	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.16±0.02	5.83±0.01
EA22	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.12±0.07	5.83±0.02
EA23	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.00	5.82±0.01

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไอโซ เลต	การติดสี แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียง เซลล์	การจัด กลุ่ม	การสร้างเอนไซม์		ค่าความเป็นกรดต่าง	
					ออกซิเดส	คะตะเลส	FJ	HEB
EA24	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.12±0.02	5.83±0.01
EA25	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.14±0.01	5.82±0.01
EA26	-	ท่อน	เดี่ยว	III	-	+	6.09±0.01	5.83±0.01
EA27	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.09±0.01	5.83±0.00
EA28	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.09±0.01	5.82±0.02
EA29	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.14±0.06	5.84±0.01
EA30	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	5.29±0.01	5.83±0.02
EA31	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.82±0.01
EA32	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.02	5.64±0.01
EA33	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.02±0.01	5.76±0.01
EA34	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.05±0.00	5.76±0.02
EA35	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.03±0.01	5.76±0.01
EA36	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.04±0.01	5.76±0.01
EA37	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.05±0.01	5.83±0.02
EA38	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.09±0.02	5.76±0.01
EA39	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.08±0.01	5.76±0.02
EA40	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.14±0.02	5.77±0.00
EA41	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.10±0.03	5.76±0.01
EA42	-	ท่อนสั้น	เดี่ยว	VI	-	-	6.10±0.01	5.76±0.01
EA43	-	ท่อนสั้น	คู่	I	+	+	6.11±0.03	5.78±0.01

ตารางผนวกที่ ๒ จำนวน *M. morgani* ATCC 25830 ในอาหารเลี้ยงที่เติมและไม่เติมสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

กะเพรา			ตะไคร้			ลูกใต้ใบ			กระเจี๊ยบ		
ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม	ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม	ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม	ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม
2.677	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	1.339	0.00±0.00 ^d	9.15±0.02	3000	0.00±0.00 ^f	8.99±0.01	375.00	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
2.454	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	1.228	0.00±0.00 ^d	9.15±0.02	2750	0.00±0.00 ^f	8.99±0.01	343.75	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
2.231	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	1.116	0.00±0.00 ^d	9.15±0.02	2500	0.00±0.00 ^f	8.99±0.01	312.50	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
2.008	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	1.004	0.00±0.00 ^d	9.15±0.02	2250	0.00±0.00 ^f	8.99±0.01	281.25	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
1.785	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	0.893	0.00±0.00 ^d	9.15±0.02	2000	3.00±0.05 ^e	8.99±0.01	250.00	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
1.562	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	0.781	0.00±0.00 ^d	9.15±0.02	1750	3.41±0.02 ^d	8.99±0.01	218.75	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
1.339	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	0.670	8.97±0.13 ^a	9.15±0.02	1500	3.50±0.05 ^d	8.99±0.01	187.50	0.00±0.00 ^c	9.02±0.04
1.116	0.00±0.00 ^c	9.09±0.01	0.558	8.21±0.08 ^{bc}	9.15±0.02	1250	4.00±0.08 ^c	8.99±0.01	156.25	2.81±0.08 ^b	9.02±0.04
0.893	8.40±0.16 ^b	9.09±0.01	0.446	8.12±0.07 ^c	9.15±0.02	1000	5.10±0.12 ^b	8.99±0.01	125.00	2.88±0.09 ^b	9.02±0.04
0.670	8.73±0.09 ^a	9.09±0.01	0.335	8.27±0.06 ^b	9.15±0.02	750	5.43±0.26 ^a	8.99±0.01	93.75	8.35±0.02 ^a	9.02±0.04

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml), ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 33 จำนวน *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	กะเพรา		ตะไคร้			ลูกใต้ใบ			กระเจี๊ยบ		
	เติม	ไม่เติม	ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม	ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม	ความเข้มข้น	เติม	ไม่เติม
1.339	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.335	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	375.00	0.00±0.00 ^c	8.42±0.03	187.50	0.00±0.00 ^c	8.65±0.04
1.228	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.307	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	343.75	0.00±0.00 ^c	8.42±0.03	171.88	0.00±0.00 ^c	8.65±0.04
1.116	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.279	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	312.50	0.00±0.00 ^c	8.42±0.03	156.25	0.00±0.00 ^c	8.65±0.04
1.004	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.251	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	281.25	0.00±0.00 ^c	8.42±0.03	140.63	0.00±0.00 ^c	8.65±0.04
0.893	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.223	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	250.00	0.00±0.00 ^c	8.42±0.03	125.00	0.00±0.00 ^c	8.65±0.04
0.781	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.195	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	218.75	2.23±0.16 ^d	8.42±0.03	109.38	0.00±0.00 ^c	8.65±0.04
0.670	0.00±0.00 ^d	8.35±0.02	0.167	0.00±0.00 ^c	8.36±0.11	187.50	2.35±0.13 ^d	8.42±0.03	93.75	1.99±0.01 ^d	8.65±0.04
0.558	4.87±0.11 ^c	8.35±0.02	0.139	4.99±0.09 ^b	8.36±0.11	156.25	2.60±0.10 ^c	8.42±0.03	78.13	7.95±0.08 ^c	8.65±0.04
0.446	6.82±0.09 ^b	8.35±0.02	0.111	8.32±0.04 ^a	8.36±0.11	125.00	4.08±0.18 ^b	8.42±0.03	62.50	8.56±0.04 ^b	8.65±0.04
0.335	7.36±0.08 ^a	8.35±0.02	0.083	8.40±0.07 ^a	8.36±0.11	93.75	5.83±0.05 ^a	8.42±0.03	46.88	8.77±0.09 ^a	8.65±0.04

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml), ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ๔ ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง

pH ของอาหาร	ระยะเวลาในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
5	0	0.00±0.00	0.00±0.00	5.06±0.05	5.05±0.04
5.7	ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01 ^B	5.76±0.01 ^A
6		0.00±0.00	0.00±0.00	6.03±0.01	6.04±0.03
7		0.00±0.00	0.00±0.00	7.04±0.05	7.01±0.01
8		0.00±0.00	0.00±0.00	8.01±0.02	8.02±0.02
9		0.00±0.00	0.00±0.00	9.00±0.01	9.02±0.02
5	24	0.00±0.00 ^{cB}	0.65±0.00 ^{aA}	5.08±0.02 ^B	6.26±0.03 ^A
5.7	ชั่วโมง	0.00±0.00 ^{cB}	0.57±0.02 ^{abA}	5.79±0.01 ^B	6.35±0.03 ^A
6		0.21±0.00 ^{abB}	0.51±0.16 ^{bA}	6.39±0.01 ^B	6.45±0.02 ^A
7		0.12±0.01 ^{bbB}	0.60±0.02 ^{abA}	6.99±0.04	7.04±0.02
8		0.00±0.00 ^{cB}	0.50±0.00 ^{bA}	7.92±0.01 ^A	7.68±0.01 ^B
9		0.00±0.00 ^{cB}	0.14±0.00 ^{cA}	8.90±0.01 ^A	8.76±0.01 ^B

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 5 ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสทามีน

pH ของอาหาร	ระยะเวลาในการบ่ม	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml)		ปริมาณฮิสทามีน (ppm)	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
5	0	3.65±0.01 ^{abB}	3.68±0.01 ^{aA}	33.48±3.58 ^A	15.14±3.11 ^B
5.7	ชั่วโมง	3.68±0.01 ^a	3.68±0.03 ^{ab}	33.48±3.58 ^A	15.14±3.11 ^B
6		3.63±0.02 ^{bc}	3.67±0.02 ^{ab}	33.48±3.58 ^A	15.14±3.11 ^B
7		3.59±0.01 ^{cd}	3.63±0.05 ^{bc}	33.48±3.58 ^A	15.14±3.11 ^B
8		3.57±0.03 ^{dB}	3.67±0.01 ^{abA}	33.48±3.58 ^A	15.14±3.11 ^B
9		3.52±0.03 ^{cB}	3.61±0.02 ^{cA}	33.48±3.58 ^A	15.14±3.11 ^B
5	24	0.00±0.00 ^{cB}	9.03±0.02 ^{aA}	33.81±6.68 ^{cB}	1385.39±222.29 ^{aA}
5.7	ชั่วโมง	0.00±0.00 ^{cB}	9.02±0.06 ^{aA}	33.81±6.68 ^{cB}	1259.87±20.96 ^{abA}
6		6.63±0.17 ^{bB}	9.00±0.01 ^{aA}	980.02±100.04 ^a	1075.76±211.37 ^b
7		7.38±0.00 ^{abB}	9.01±0.06 ^{aA}	48.40±0.53 ^{bB}	519.99±78.45 ^{cA}
8		0.00±0.00 ^{cB}	9.01±0.02 ^{aA}	33.81±6.68 ^{cB}	94.93±24.25 ^{dA}
9		0.00±0.00 ^{cB}	8.03±0.02 ^{bA}	33.81±6.68 ^{cA}	15.48±2.04 ^{dB}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวดิ่งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ๖ ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง

pH ของอาหาร	ระยะเวลาในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
5	0	0.00±0.00	0.00±0.00	5.07±0.03 ^A	5.00±0.01 ^B
5.7	ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.71±0.01
6		0.00±0.00	0.00±0.00	6.06±0.04	6.01±0.02
7		0.00±0.00	0.00±0.00	7.03±0.02	7.01±0.01
8		0.00±0.00	0.00±0.00	8.01±0.01	8.00±0.02
9		0.00±0.00	0.00±0.00	8.98±0.01	9.00±0.02
5	24	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^f	5.12±0.03	5.12±0.02
5.7	ชั่วโมง	0.00±0.00 ^{bb}	0.43±0.01 ^{dA}	5.76±0.02 ^B	6.12±0.03 ^A
6		0.19±0.01 ^{ab}	0.35±0.01 ^{eA}	6.16±0.04	6.14±0.04
7		0.00±0.00 ^{bb}	1.00±0.01 ^{bA}	7.04±0.02	7.04±0.01
8		0.00±0.00 ^{bb}	1.11±0.03 ^{aA}	7.97±0.05 ^B	8.07±0.03 ^A
9		0.00±0.00 ^{bb}	0.88±0.02 ^{cA}	8.78±0.01 ^A	8.54±0.06 ^B

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ๗7 ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสทามีน

pH ของ อาหาร	ระยะ เวลาใน การบ่ม	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด		ปริมาณฮิสทามีน		
		(logCFU/ml)		(ppm)		
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	
5	0	3.58±0.23 ^a	3.62±0.07 ^b	32.39±1.01 ^A	15.87±1.45 ^B	
5.7	ชั่วโมง	3.74±0.05 ^a	3.75±0.01 ^a	32.39±1.01 ^A	15.87±1.45 ^B	
6		3.33±0.11 ^b	3.44±0.06 ^c	32.39±1.01 ^A	15.87±1.45 ^B	
7		3.34±0.05 ^b	3.45±0.11 ^c	32.39±1.01 ^A	15.87±1.45 ^B	
8		3.63±0.09 ^{sA}	3.29±0.02 ^{dB}	32.39±1.01 ^A	15.87±1.45 ^B	
9		3.61±0.01 ^{sA}	3.26±0.06 ^{dB}	32.39±1.01 ^A	15.87±1.45 ^B	
5		24	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	40.07±2.81 ^A	15.07±2.14 ^{cB}
5.7		0.00±0.00 ^{bb}	8.52±0.07 ^{aa}	40.07±2.81 ^B	860.65±9.76 ^{aa}	
6	5.24±0.07 ^{ab}	8.02±0.58 ^{ba}	42.13±2.67 ^B	858.37±28.80 ^{aa}		
7	0.00±0.00 ^{bb}	8.01±0.06 ^{ba}	40.07±2.81 ^B	217.16±18.04 ^{ba}		
8	0.00±0.00 ^{bb}	7.98±0.07 ^{ba}	40.07±2.81	35.01±5.25 ^c		
9	0.00±0.00 ^{bb}	7.77±0.02 ^{ba}	40.07±2.81 ^A	16.47±2.97 ^{cB}		

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวดิ่งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 8 ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. organii* ATCC 25830

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา ในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง		ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml)		ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
4	0 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.73±0.02 ^a	5.72±0.03	3.72±0.02	3.75±0.05	28.38±7.64	14.46±2.69
10		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01 ^b	5.71±0.01	3.69±0.04	3.64±0.03	28.38±7.64	14.46±2.69
25		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01 ^b	5.70±0.01	3.73±0.02	3.68±0.05	28.38±7.64	14.46±2.69
35		0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.00 ^b	5.71±0.00	3.69±0.10	3.67±0.02	28.38±7.64	14.46±2.69
45		0.00±0.00	0.00±0.00	5.69±0.01 ^b	5.70±0.02	3.72±0.05	3.71±0.02	28.38±7.64	14.46±2.69
4	24 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	5.70±0.02	5.73±0.03 ^c	0.00±0.00	0.00±0.00 ^b	46.38±21.97	15.82±1.56 ^c
10		0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	5.68±0.01 ^B	5.70±0.01 ^{cA}	0.00±0.00	0.00±0.00 ^b	46.38±21.97	15.82±1.56 ^c
25		0.00±0.00 ^B	0.69±0.01 ^{aA}	5.68±0.01 ^B	6.39±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^B	9.03±0.02 ^{aA}	46.38±21.97 ^B	1451.59±113.16 ^{aA}
35		0.00±0.00 ^B	0.64±0.01 ^{ba}	5.68±0.01 ^B	6.32±0.01 ^{ba}	0.00±0.00 ^B	9.03±0.03 ^{aA}	46.38±21.97 ^B	1260.45±39.41 ^{ba}
45		0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	5.67±0.01 ^B	5.70±0.01 ^{cA}	0.00±0.00	0.00±0.00 ^b	46.38±21.97	15.82±1.56 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 9 ผลของอุณหภูมิในการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา ในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง		ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml)		ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
4	0 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.71±0.01 ^{ab}	3.69±0.06 ^{ab}	3.83±0.02 ^A	37.11±0.93 ^A	13.90±1.09 ^B
10		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.71±0.01 ^b	3.59±0.03 ^{bb}	3.83±0.02 ^A	37.11±0.93 ^A	13.90±1.09 ^B
25		0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.01	5.70±0.01 ^b	3.65±0.01 ^{ab}	3.85±0.01 ^A	37.11±0.93 ^A	13.90±1.09 ^B
35		0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.02	5.72±0.01 ^a	3.70±0.02 ^{ab}	3.84±0.03 ^A	37.11±0.93 ^A	13.90±1.09 ^B
45		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.02	5.71±0.01 ^b	3.58±0.02 ^{bb}	3.86±0.02 ^A	37.11±0.93 ^A	13.90±1.09 ^B
4	24 ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	0.09±0.00 ^{dA}	5.74±0.03 ^{cb}	5.86±0.01 ^{dA}	0.00±0.00 ^B	4.73±0.17 ^{cA}	38.70±0.43 ^A	21.03±1.11 ^{cb}
10		0.00±0.00 ^B	0.34±0.03 ^{cA}	5.76±0.01 ^{bcB}	5.99±0.06 ^{cA}	0.00±0.00 ^B	5.51±0.28 ^{bA}	38.70±0.43 ^A	27.60±2.83 ^{cb}
25		0.00±0.00 ^B	1.10±0.13 ^{bA}	5.86±0.01 ^{ab}	6.08±0.01 ^{bA}	0.00±0.00 ^B	7.70±0.16 ^{aA}	38.70±0.43 ^B	745.10±194.38 ^{bA}
35		0.00±0.00 ^B	1.25±0.09 ^{aA}	5.89±0.00 ^{ab}	6.18±0.04 ^{aA}	0.00±0.00 ^B	7.77±0.22 ^{aA}	38.70±0.43 ^B	971.69±17.34 ^{aA}
45		0.00±0.00	0.00±0.00 ^d	5.80±0.05 ^b	5.78±0.07 ^d	0.00±0.00	0.00±0.00 ^d	38.70±0.43 ^A	15.14±0.25 ^{cb}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวดิ่งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกัน ในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 10 ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. organii* ATCC 25830 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง

ปริมาณเกลือ (%)	ระยะเวลาในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
0	0 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.01	5.71±0.01
0.5		0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.02	5.72±0.01
1		0.00±0.00	0.00±0.00	5.69±0.01 ^B	5.72±0.01 ^A
3		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.02	5.70±0.01
10		0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.02	5.72±0.01
20		0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.01	5.71±0.01
0	24 ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	0.47±0.01 ^{dA}	5.70±0.02 ^{dB}	6.30±0.02 ^{cA}
0.5		0.01±0.00 ^B	0.64±0.02 ^{bA}	5.78±0.01 ^{abB}	6.36±0.01 ^{aA}
1		0.00±0.00 ^B	0.68±0.01 ^{aA}	5.74±0.02 ^{cB}	6.32±0.02 ^{bcA}
3		0.00±0.00 ^B	0.51±0.01 ^{cA}	5.79±0.01 ^{abB}	6.34±0.01 ^{abA}
10		0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	5.77±0.01 ^{bc}	5.80±0.02 ^d
20		0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	5.75±0.02 ^c	5.75±0.01 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 11 ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย จากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. organii* ATCC 25830 เมื่อพิจารณา จากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสทามีน

ปริมาณ เกลือ (%)	ระยะ เวลาใน การบ่ม	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด		ปริมาณฮิสทามีน	
		(logCFU/ml)		(ppm)	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
0	0	3.65±0.01	3.62±0.02 ^b	25.33±2.12 ^A	16.84±2.12 ^B
0.5	ชั่วโมง	3.68±0.02	3.66±0.03 ^a	25.33±2.12 ^A	16.84±2.12 ^B
1		3.65±0.01	3.65±0.01 ^{ab}	25.33±2.12 ^A	16.84±2.12 ^B
3		3.66±0.04	3.67±0.01 ^a	25.33±2.12 ^A	16.84±2.12 ^B
10		3.65±0.03	3.65±0.01 ^{ab}	25.33±2.12 ^A	16.84±2.12 ^B
20		3.62±0.01 ^B	3.67±0.02 ^{aA}	25.33±2.12 ^A	16.84±2.12 ^B
0	24	0.00±0.00 ^B	9.01±0.02 ^{abA}	30.42±3.11 ^B	1043.68±33.13 ^{cA}
0.5	ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	9.03±0.09 ^{aA}	30.42±3.11 ^B	1270.98±17.94 ^{abA}
1		0.00±0.00 ^B	9.08±0.00 ^{aA}	30.42±3.11 ^B	1287.61±142.46 ^{aA}
3		0.00±0.00 ^B	8.96±0.01 ^{bA}	30.42±3.11 ^B	1170.14±31.58 ^{ba}
10		0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	30.42±3.11 ^B	17.18±1.56 ^{dA}
20		0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	30.42±3.11 ^B	17.18±1.56 ^{dA}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวดิ่งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 12 ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่นและค่าความเป็นกรดต่าง

ปริมาณเกลือ (%)	ระยะเวลาในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
0	0 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.70±0.01
0.5		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.02	5.72±0.02
1		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.00	5.70±0.02
3		0.00±0.00	0.00±0.00	5.69±0.01	5.70±0.00
10		0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.01	5.71±0.01
20		0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.72±0.02
0	24 ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	0.64±0.02 ^{dA}	5.69±0.01 ^{bB}	6.10±0.04 ^{bA}
0.5		0.00±0.00 ^B	1.27±0.01 ^{bA}	5.76±0.02 ^{abB}	6.16±0.02 ^{aA}
1		0.00±0.00 ^B	1.40±0.03 ^{aA}	5.76±0.03 ^{abB}	6.17±0.01 ^{aA}
3		0.00±0.00 ^B	1.20±0.03 ^{cA}	5.76±0.04 ^{abB}	6.07±0.05 ^{bA}
10		0.00±0.00 ^B	0.49±0.02 ^{cA}	5.75±0.01 ^{abB}	5.96±0.03 ^{cA}
20		0.00±0.00	0.00±0.00 ^f	5.75±0.02 ^a	5.72±0.02 ^d

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 13 ผลของปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณฮิสตามีน

ปริมาณเกลือ (%)	ระยะเวลาในการบ่ม	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml)		ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	
		เติม	ไม่เติม	เติม	ไม่เติม
		0	0	3.81±0.07	3.71±0.09
0.5	ชั่วโมง	3.75±0.05	3.77±0.10	33.58±2.40 ^A	16.26±0.77 ^B
1		3.83±0.03	3.84±0.03	33.58±2.40 ^A	16.26±0.77 ^B
3		3.73±0.06	3.77±0.01	33.58±2.40 ^A	16.26±0.77 ^B
10		3.78±0.12	3.80±0.04	33.58±2.40 ^A	16.26±0.77 ^B
20		3.84±0.02 ^A	3.79±0.03 ^B	33.58±2.40 ^A	16.26±0.77 ^B
0		24	0.00±0.00 ^B	7.14±0.13 ^{bA}	38.37±3.74 ^B
0.5	ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	8.00±0.07 ^{aA}	38.37±3.74 ^B	945.32±13.96 ^{aA}
1		0.00±0.00 ^B	7.85±0.09 ^{aA}	38.37±3.74 ^B	922.69±4.73 ^{bA}
3		0.00±0.00 ^B	7.83±0.08 ^{aA}	38.37±3.74 ^B	881.09±13.37 ^{cA}
10		0.00±0.00 ^B	6.77±0.13 ^{cA}	38.37±3.74 ^A	18.79±1.29 ^{eB}
20		0.00±0.00	0.00±0.00 ^d	38.37±3.74 ^A	17.18±1.56 ^{eB}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวดิ่งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *M. morgani* ATCC 25830

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา ในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดค้าง		ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml)		ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
-20	0 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.69±0.01	3.53±0.05 ^c	3.46±0.08 ^b	26.35±2.12 ^A	15.14±0.59 ^B
	4	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01	5.70±0.01	3.59±0.01 ^{ab}	3.56±0.05 ^a	26.35±2.12 ^A	15.14±0.59 ^B
	10	0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.01	5.71±0.01	3.63±0.03 ^{aA}	3.53±0.05 ^{abB}	26.35±2.12 ^A	15.14±0.59 ^B
	80	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.02	5.71±0.01	3.55±0.03 ^{bcB}	3.62±0.03 ^{aA}	26.35±2.12 ^A	15.14±0.59 ^B
	80	0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.01	5.71±0.01	3.58±0.02 ^{abc}	3.58±0.02 ^a	26.35±2.12 ^A	15.14±0.59 ^B
-20	24 ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	0.59±0.01 ^A	5.78±0.01 ^{abB}	6.37±0.01 ^{cA}	0.00±0.00 ^B	9.37±0.19 ^{bA}	28.38±2.56 ^B	999.03±70.54 ^{cA}
	4	0.00±0.00 ^B	0.59±0.01 ^A	5.78±0.00 ^{abB}	6.37±0.0 ^{cA}	0.00±0.00 ^B	9.51±0.06 ^{abA}	28.38±2.56 ^B	961.69±17.40 ^{cA}
	10	0.00±0.00 ^B	0.60±0.02 ^A	5.75±0.01 ^{bbB}	6.38±0.01 ^{bcA}	0.00±0.00 ^B	9.60±0.07 ^{aA}	28.38±2.56 ^B	1041.81±38.72 ^{cA}
	80	0.00±0.00 ^B	0.60±0.01 ^A	5.79±0.00 ^{abB}	6.40±0.01 ^{aaA}	0.00±0.00 ^B	9.65±0.08 ^{aA}	28.38±2.56 ^B	1481.13±99.86 ^{aaA}
	80	0.00±0.00 ^B	0.59±0.01 ^A	5.75±0.03 ^{bbB}	6.40±0.00 ^{abA}	0.00±0.00 ^B	9.04±0.04 ^{cA}	28.38±2.56 ^B	1172.86±72.60 ^{baA}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 15 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา ในการบ่ม	ค่าความขุ่น (OD ₆₀₀)		ค่าความเป็นกรดต่าง		ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/ml)		ปริมาณฮิสตามีน (ppm)	
		เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม	เต็ม	ไม่เต็ม
-20	0 ชั่วโมง	0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.01	5.70±0.01 ^c	3.62±0.04 ^b	3.60±0.05 ^b	36.59±3.93 ^A	14.57±1.21 ^B
	4	0.00±0.00	0.00±0.00	5.71±0.01 ^B	5.73±0.01 ^{aA}	3.69±0.02 ^a	3.78±0.08 ^a	36.59±3.93 ^A	14.57±1.21 ^B
	10	0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.01	5.71±0.01 ^{bc}	3.67±0.01 ^a	3.69±0.06 ^{ab}	36.59±3.93 ^A	14.57±1.21 ^B
	80	0.00±0.00	0.00±0.00	5.70±0.01	5.70±0.01 ^c	3.66±0.02 ^{ab}	3.77±0.04 ^{aA}	36.59±3.93 ^A	14.57±1.21 ^B
	80	0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.01	5.73±0.01 ^{ab}	3.67±0.01 ^a	3.67±0.08 ^{ab}	36.59±3.93 ^A	14.57±1.21 ^B
-20	24 ชั่วโมง	0.00±0.00 ^B	1.15±0.10 ^A	5.73±0.03 ^B	6.13±0.03 ^{abA}	0.00±0.00 ^B	7.07±0.03 ^{cA}	37.15±2.01 ^B	770.31±7.54 ^{dA}
	4	0.00±0.00 ^B	1.23±0.14 ^A	5.73±0.02 ^B	6.16±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^B	7.15±0.04 ^{bcA}	37.15±2.01 ^B	787.93±12.62 ^{cA}
	10	0.00±0.00 ^B	1.24±0.02 ^A	5.77±0.03 ^B	6.12±0.02 ^{ba}	0.00±0.00 ^B	7.29±0.07 ^{aA}	37.15±2.01 ^B	825.41±10.48 ^{ba}
	80	0.00±0.00 ^B	1.19±0.01 ^A	5.75±0.01 ^B	6.09±0.02 ^{ba}	0.00±0.00 ^B	7.26±0.05 ^{aA}	37.15±2.01 ^B	843.14±4.86 ^{aA}
	80	0.00±0.00 ^B	1.22±0.02 ^A	5.74±0.01 ^B	6.13±0.02 ^{abA}	0.00±0.00 ^B	7.23±0.04 ^{abA}	37.15±2.01 ^B	830.99±7.40 ^{abA}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวดิ่งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละลักษณะที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 16 ปริมาณ *M. morgani* ATCC 25830 และ *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64 ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ <i>M. morgani</i> ATCC 25830 (logCFU/ml)	
	วิธีการวิเคราะห์	
	pour plate	spread plate
Tryptic soy agar	4.67±0.04 ^a	4.66±0.18
Plate count agar	4.57±0.07 ^a	4.64±0.02
modified Niven's medium	3.08±0.06 ^{bb}	4.60±0.05 ^A
อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64 (logCFU/ml)	
	วิธีการวิเคราะห์	
	pour plate	spread plate
Tryptic soy agar	4.25±0.07 ^a	5.01±0.24
Plate count agar	4.42±0.31 ^a	5.12±0.23
modified Niven's medium	2.98±0.04 ^{bb}	4.46±0.37 ^A

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของปลาทูสคที่จุ่มและไม่จุ่มในสารละลายแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนที่มีปริมาณเซลล์ต่างกัน

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)	
	ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ (CFU/ml)	
	10 ⁴	10 ⁷
ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ	4.31±0.01 ^c	4.32±0.01 ^c
ปลาที่จุ่มด้วย <i>M. organii</i> ATCC 25830	4.65±0.01 ^{bb}	5.04±0.01 ^{ba}
ปลาที่จุ่มด้วย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	5.04±0.01 ^{ab}	5.15±0.01 ^{aa}
ตัวอย่างที่ทดสอบ	ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน (logCFU/g)	
	ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ (CFU/ml)	
	10 ⁴	10 ⁷
ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ	3.20±0.01 ^{cb}	3.26±0.00 ^{ca}
ปลาที่จุ่มด้วย <i>M. organii</i> ATCC 25830	3.38±0.01 ^{bb}	4.79±0.01 ^{ba}
ปลาที่จุ่มด้วย <i>Psychrobacter</i> sp. สายพันธุ์ RK64	3.70±0.00 ^{ab}	4.97±0.00 ^{aa}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 18 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนในปลาทุสดที่มีและไม่มีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีนและจุ่มในสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)		
	ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ	ปลาที่จุ่มด้วย MM	ปลาที่จุ่มด้วย PB
0	4.95±0.00 ^{aC}	5.61±0.02 ^{ab}	5.73±0.01 ^{aA}
0.78	4.88±0.01 ^{bC}	4.92±0.02 ^{bb}	5.15±0.01 ^{bA}
1.56	4.88±0.01 ^{cC}	4.88±0.00 ^{cb}	4.94±0.00 ^{cA}
3.12	4.68±0.00 ^{dC}	4.74±0.01 ^{db}	4.82±0.01 ^{dA}
6.24	4.23±0.01 ^{eC}	4.15±0.01 ^{eb}	4.60±0.00 ^{eA}
ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสทามีน (logCFU/g)		
	ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ	ปลาที่จุ่มด้วย MM	ปลาที่จุ่มด้วย PB
0	4.26±0.02 ^{aC}	5.38±0.01 ^{ab}	5.50±0.01 ^{aA}
0.78	4.20±0.01 ^{bC}	4.53±0.01 ^{Bb}	4.88±0.03 ^{bA}
1.56	4.15±0.01 ^{cC}	4.34±0.01 ^{cb}	4.68±0.01 ^{cA}
3.12	3.60±0.00 ^{dC}	4.30±0.00 ^{dA}	3.70±0.02 ^{dB}
6.24	2.18±0.03 ^{eC}	2.74±0.02 ^{eA}	2.54±0.01 ^{eb}

หมายเหตุ MM = *M. morgani* ATCC 25830, PB = *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 19 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน (logCFU/g)					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
4	0	3.24±0.23 ^{cdB}	2.75±0.13 ^{deC}	5.64±0.01 ^{cA}	5.25±0.07 ^{bcA}	5.33±0.35 ^{dA}	3.70±0.19 ^{hB}
	1	2.85±0.28 ^{dB}	2.57±0.38 ^{eC}	4.21±0.29 ^{dA}	3.46±0.11 ^{eB}	4.55±0.04 ^{eA}	2.59±0.27 ^{gC}
	3	3.78±0.42 ^{eBC}	3.00±0.00 ^{deD}	4.23±0.07 ^{dAB}	3.09±0.55 ^{eCD}	4.71±0.15 ^{eA}	3.85±0.21 ^{fgBC}
	5	5.33±0.21 ^{bAB}	5.02±0.09 ^{bABC}	5.61±0.21 ^{cA}	4.71±0.24 ^{cC}	5.56±0.36 ^{cdA}	4.77±0.23 ^{efBC}
	7	4.93±0.21 ^{bB}	4.20±0.28 ^{cC}	4.39±0.13 ^{dC}	4.15±0.21 ^{dC}	5.96±0.21 ^{cA}	4.36±0.08 ^{eC}
	9	3.68±0.04 ^{cC}	3.09±0.13 ^{dD}	4.34±0.06 ^{dB}	3.11±0.30 ^{eD}	5.60±0.23 ^{cdA}	4.20±0.00 ^{dB}
	11	6.46±0.32 ^{aA}	6.36±0.29 ^{aAB}	5.93±0.07 ^{bcBC}	5.53±0.00 ^{bCD}	6.46±0.06 ^{bA}	5.29±0.01 ^{dD}
	13	6.78±0.18 ^{aA}	6.23±0.16 ^{aB}	6.08±0.00 ^{abBC}	5.83±0.15 ^{abC}	6.76±0.03 ^{abA}	6.03±0.18 ^{bbC}
	15	6.79±0.13 ^{aB}	6.12±0.11 ^{aD}	6.29±0.13 ^{aCD}	6.26±0.04 ^{aCD}	7.18±0.14 ^{aA}	6.47±0.10 ^{aC}

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. morgani* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 20 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน (logCFU/g)					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
10	0	3.26±0.11 ^{cC}	2.60±0.08 ^{cD}	5.63±0.01 ^{cA}	5.31±0.04 ^{bA}	5.50±0.28 ^{bA}	3.63±0.13 ^{cB}
	1	3.77±0.33 ^{cC}	3.85±0.21 ^{bC}	5.88±0.13 ^{cA}	5.00±0.49 ^{bB}	5.69±0.39 ^{bAB}	5.17±0.24 ^{bAB}
	3	7.19±0.06 ^{aA}	6.31±0.71 ^{aB}	7.57±0.22 ^{bA}	7.57±0.22 ^{aA}	7.68±0.21 ^{aA}	6.95±0.18 ^{aAB}
	5	6.35±0.49 ^{bBC}	5.52±0.74 ^{aC}	7.96±0.05 ^{aA}	7.52±0.00 ^{aA}	7.60±0.03 ^{aA}	7.00±0.22 ^{aAB}
	7	6.59±0.06 ^{abD}	6.39±0.09 ^{aD}	8.06±0.04 ^{aA}	7.77±0.05 ^{aB}	7.90±0.04 ^{aAB}	7.00±0.15 ^{aC}
อุณหภูมิ ห้อง	0 ชม.	3.33±0.18 ^{cB}	2.47±0.10 ^{cC}	5.64±0.29 ^{cA}	5.40±0.11 ^{cA}	5.43±0.28 ^{cA}	3.59±0.01 ^{cB}
	6 ชม.	6.87±0.11 ^{bAB}	5.95±0.49 ^{bC}	7.19±0.01 ^{bA}	6.30±0.06 ^{dC}	7.30±0.00 ^{bA}	6.39±0.06 ^{bBC}
	12 ชม.	7.19±0.11 ^{abB}	6.91±0.02 ^{aC}	7.46±0.04 ^{bA}	7.08±0.00 ^{cB}	7.37±0.06 ^{bA}	7.10±0.02 ^{aB}
	18 ชม.	7.19±0.16 ^{abC}	7.10±0.02 ^{aC}	8.43±0.09 ^{aA}	8.10±0.08 ^{bB}	8.10±0.08 ^{aB}	7.14±0.08 ^{aC}
	24 ชม.	7.39±0.13 ^{aC}	7.15±0.21 ^{aC}	8.73±0.16 ^{aA}	8.71±0.10 ^{aA}	8.16±0.17 ^{aB}	7.20±0.28 ^{aC}

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. morgani* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแต่ละแถวและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ ในแต่ละอุณหภูมิที่เก็บรักษา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 21 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
4	0	5.13±0.03 ^{fC}	4.06±0.08 ^{eE}	5.91±0.01 ^{cA}	5.34±0.03 ^{fB}	6.01±0.10 ^{cA}	4.33±0.01 ^{cdD}
	1	4.04±0.00 ^{hBC}	3.88±0.10 ^{eBCD}	4.37±0.30 ^{eAB}	3.74±0.29 ^{fCD}	4.87±0.16 ^{dA}	3.37±0.30 ^{eD}
	3	4.79±0.01 ^{gAB}	4.64±0.01 ^{dAB}	4.60±0.03 ^{eAB}	3.42±0.59 ^{eC}	5.10±0.28 ^{dA}	4.21±0.04 ^{dB}
	5	5.63±0.14 ^{eC}	5.39±0.04 ^{cd}	5.84±0.12 ^{cb}	5.22±0.06 ^{deD}	6.12±0.05 ^{cA}	5.39±0.01 ^{bd}
	7	6.64±0.29 ^{cA}	5.39±0.04 ^{cC}	5.33±0.35 ^{dC}	4.51±0.04 ^{cdD}	6.05±0.09 ^{cb}	4.47±0.10 ^{cdD}
	9	6.19±0.01 ^{dA}	5.25±0.35 ^{cBC}	5.71±0.02 ^{cdAB}	4.83±0.24 ^{cdCD}	5.98±0.03 ^{cA}	4.64±0.33 ^{cd}
	11	7.23±0.07 ^{bA}	5.63±0.23 ^{cd}	6.10±0.08 ^{bcC}	5.73±0.14 ^{bcCD}	6.63±0.18 ^{bb}	5.78±0.19 ^{bcD}
	13	7.39±0.09 ^{abA}	6.62±0.06 ^{bc}	6.31±0.07 ^{abd}	6.08±0.05 ^{abE}	6.90±0.07 ^{bb}	6.42±0.11 ^{ad}
	15	7.52±0.09 ^{aA}	7.09±0.13 ^{abc}	6.53±0.10 ^{ad}	6.45±0.31 ^{ad}	7.23±0.07 ^{abB}	6.73±0.15 ^{acd}

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. morgani* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 22 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
10	0	5.15±0.16 ^{dA}	3.97±0.10 ^{dB}	5.86±0.03 ^{cA}	5.53±0.27 ^{cA}	5.82±0.62 ^{bA}	4.32±0.06 ^{bB}
	1	5.64±0.15 ^{cA}	4.87±0.24 ^{cB}	5.92±0.17 ^{cA}	5.51±0.13 ^{cA}	5.91±0.25 ^{bA}	5.79±0.24 ^{aA}
	3	7.59±0.16 ^b	7.33±0.04 ^b	7.57±0.22 ^b	7.47±0.21 ^b	7.89±0.13 ^a	7.38±0.25 ^a
	5	7.40±0.05 ^{abC}	7.10±0.02 ^{abD}	8.02±0.03 ^{aA}	7.55±0.02 ^{bBC}	8.14±0.08 ^{aA}	7.62±0.12 ^{aB}
	7	7.83±0.05 ^{aC}	7.65±0.12 ^{aD}	8.19±0.03 ^{aB}	7.98±0.06 ^{aC}	8.45±0.01 ^{aA}	7.91±0.11 ^{aC}
อุณหภูมิ ห้อง	0 ชม.	5.23±0.16 ^{cA}	3.98±0.19 ^{cB}	5.82±0.08 ^{cA}	5.56±0.31 ^{dA}	5.73±0.49 ^{dA}	4.11±0.33 ^{cB}
	6 ชม.	7.14±0.08 ^{dB}	6.63±0.05 ^{bC}	7.64±0.01 ^{dA}	6.67±0.03 ^{cC}	7.57±0.17 ^{cA}	6.76±0.02 ^{bC}
	12 ชม.	7.65±0.06 ^{cB}	7.46±0.04 ^{aC}	7.87±0.06 ^{cA}	7.43±0.13 ^{bC}	7.72±0.05 ^{bcAB}	7.37±0.01 ^{abC}
	18 ชม.	8.40±0.02 ^{bA}	7.51±0.27 ^{abB}	8.65±0.04 ^{bA}	8.40±0.11 ^{aA}	8.26±0.04 ^{abA}	7.50±0.31 ^{aB}
	24 ชม.	8.73±0.04 ^{aB}	7.85±0.15 ^{aC}	8.88±0.03 ^{aA}	8.80±0.01 ^{aAB}	8.43±0.12 ^{aB}	7.97±0.37 ^{aC}

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. morgani* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแต่ละแถวและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ ในแต่ละอุณหภูมิที่เก็บรักษา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 23 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่าความเป็นกรดต่าง					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
4	0	6.27±0.10 ^{abc}	6.24±0.20	6.24±0.06 ^c	6.46±0.06 ^a	6.27±0.14 ^{bc}	6.36±0.08
	1	6.36±0.09 ^{abcAB}	6.43±0.03 ^A	6.40±0.04 ^{bcA}	6.23±0.05 ^{cdBC}	6.24±0.03 ^{cBC}	6.18±0.07 ^C
	3	6.10±0.08 ^{cC}	6.36±0.08 ^{AB}	6.51±0.05 ^{abA}	6.38±0.05 ^{abcAB}	6.30±0.09 ^{bcB}	6.44±0.10 ^{AB}
	5	6.15±0.08 ^c	6.20±0.06	6.23±0.01 ^c	6.14±0.10 ^d	6.29±0.11 ^{bc}	6.14±0.02
	7	6.46±0.01 ^{ab}	6.29±0.04	6.31±0.08 ^{bc}	6.38±0.09 ^{abc}	6.33±0.03 ^{bc}	6.31±0.11
	9	6.22±0.14 ^{bc}	6.16±0.01	6.37±0.16 ^{bc}	6.42±0.04 ^{ab}	6.28±0.06 ^{bc}	6.24±0.02
	11	6.54±0.16 ^a	6.27±0.08	6.37±0.13 ^{bc}	6.27±0.07 ^{bcd}	6.38±0.11 ^{bc}	6.30±0.28
	13	6.50±0.09 ^{abC}	6.29±0.00 ^D	6.63±0.04 ^{aA}	6.39±0.03 ^{abCD}	6.61±0.05 ^{aAB}	6.40±0.04 ^{CD}
	15	6.53±0.12 ^a	6.45±0.19	6.66±0.16 ^a	6.50±0.06 ^a	6.48±0.10 ^{ab}	6.47±0.13

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. organii* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแต่ละแถวและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 24 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างในปลาทุสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่าความเป็นกรดต่าง					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
10	0	6.36±0.08	6.44±0.08	6.25±0.05	6.51±0.04	6.36±0.08	6.34±0.03
	1	6.37±0.06	6.28±0.14	6.31±0.04	6.27±0.00	6.32±0.07	6.30±0.01
	3	6.28±0.07	6.32±0.18	6.31±0.01	6.37±0.10	6.25±0.04	6.34±0.01
	5	6.37±0.05	6.33±0.08	6.43±0.11	6.44±0.01	6.31±0.28	6.42±0.19
	7	6.41±0.04	6.43±0.03	6.40±0.04	6.44±0.11	6.40±0.03	6.38±0.04
อุณหภูมิ ห้อง	0 ชม.	6.35±0.17	6.39±0.18	6.33±0.04 ^c	6.53±0.01 ^b	6.29±0.02 ^c	6.36±0.01
	6 ชม.	6.37±0.14	6.49±0.11	6.36±0.00 ^c	6.50±0.06 ^b	6.38±0.08 ^{bc}	6.41±0.08
	12 ชม.	6.41±0.17	6.54±0.09	6.31±0.17 ^c	6.51±0.02 ^b	6.43±0.03 ^b	6.53±0.06
	18 ชม.	6.66±0.05 ^A	6.51±0.01 ^{BC}	6.62±0.01 ^{bA}	6.38±0.06 ^{cd}	6.59±0.02 ^{aAB}	6.43±0.02 ^{cd}
	24 ชม.	6.73±0.04	6.55±0.03	6.90±0.13 ^a	6.70±0.02 ^a	6.67±0.01 ^a	6.60±0.21

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. morgani* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64, ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กต่างกันในแนวตั้งและอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ต่างกันในแนวนอน ในแต่ละอุณหภูมิที่เก็บรักษา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 25 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการไม่ยอมรับในปลาอุสที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิที่เก็บรักษา (°C)	ระยะเวลาการเก็บ	ระดับการไม่ยอมรับ					
		NC(-)	NC(+)	MM(-)	MM(+)	PB(-)	PB(+)
4	0 วัน	1	1	1	1	1	1
	1 วัน	2	2	2	2	2	2
	3 วัน	2	2	2	1	2	2
	5 วัน	2	2	2	2	2	2
	7 วัน	2	2	2	2	2	2
	9 วัน	3	3	3	2	3	2
	11 วัน	3	3	3	3	3	3
	13 วัน	4	3	3	3	3	3
	15 วัน	4	3	4	4	4	4
10	0 วัน	1	1	1	1	1	1
	1 วัน	2	2	2	2	2	2
	3 วัน	3	2	3	2	3	2
	5 วัน	4	3	3	3	4	3
	7 วัน	4	4	4	4	4	4
อุณหภูมิห้อง	0 ชม.	1	1	1	1	1	1
	6 ชม.	1	1	2	1	2	1
	12 ชม.	3	3	3	3	3	3
	18 ชม.	4	3	4	3	4	3
	24 ชม.	4	4	4	4	4	4

หมายเหตุ NC = ปลาที่ไม่จุ่มเชื้อ, MM = ปลาที่จุ่มด้วย *M. morgani* ATCC 25830, PB = ปลาที่จุ่มด้วย *Psychrobacter* sp. สายพันธุ์ RK64,

ภาคผนวก จ

บทคัดย่อของผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์

ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิด
ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน

**Effect of some essential oils and indigenous plant extracts
on the growth inhibition of histamine-forming bacteria**

นางพางา แสงเจริญ¹ นงนุช รุกสกุลไทย¹ วรรณมาลา พันธุ์² และ พงษ์เทพ วิไลพันธ์^{1*}

Nongpanga Sangcharoen¹, Nongnuch Ruksakulthai¹ Wanna Malaphan² and Pongtep Wilaipun¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนจากตัวอย่างปลาในกลุ่ม scombrotoxic รวมถึงคัดเลือกชนิดของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดด้วยเอทานอลของพืชพื้นบ้าน ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนทั้ง 6 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ สารสกัดจากกระถิน และลูกใต้ใบสามารถยับยั้งได้เพียง 5 สายพันธุ์ เมื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารดังกล่าวต่อแบคทีเรียทดสอบ พบว่าน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *Morganella morganii* ATCC 25830 (สายพันธุ์อ้างอิงที่สามารถสร้างฮีสตามีน) โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 0.78 µg/ml และมีค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ RK64 ซึ่งคัดแยกได้ในการทดลองนี้ เท่ากับ 0.14 และ 0.17 µg/ml ตามลำดับ

ABSTRACT

The aims of this study were the isolation of histamine-forming bacteria from scombroid fish as well as the screening for antimicrobial activity of some selected essential oils and ethanolic indigenous plant extracts on growth of the isolated bacterial strains. Essential oil of holy basil and ethanolic extract of roselle inhibited all of 6 tested strains. Whereas, essential oil of lemongrass, ethanolic extract of lead tree and egg woman inhibited only 5 tested strains. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of selected essential oils and ethanolic indigenous plant extracts on histamine-forming bacteria indicated that essential oil of lemongrass showed the highest inhibitory effect (MIC and MBC = 0.78 µg/ml) against *Morganella morganii* ATCC 25830, a reference histamine-forming bacteria, and showed the MIC and MBC against RK64 strain, isolated strain from this study, at 0.14 and 0.17 µg/ml, respectively.

Key words: histamine-forming bacteria, antimicrobial activity, essential oil, plant extract, *Morganella morganii*.

*E-mail address: ffisptw@ku.ac.th

¹ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University.

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางพงา แสงเจริญ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2546)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์	นางพงา แสงเจริญ, นางนุช รักสกุลไทย, วรณา มาลาพันธ์ และ พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2552. ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน, น. 608-617. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. เมื่อ 17-20 มีนาคม 2552
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2550)