รหัสโครงการ SUT3-305-42-29-02

รายงานการวิจัย

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา

Factors Affecting Histamine Formation in Fish Sauce Fermentation

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปี งบประมาณ พ.ศ. 2542 - พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2546

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2542 - 2544 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. กนกอร อินทราพิเชฐ ที่ช่วยในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างน้ำปลา ขอขอบคุณ Dr. Y.J. Choi แห่ง Gyeongsang National University, Korea ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระ ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยที่ทำงานอย่างอดทน มุมานะ จนทำให้โครงการสำเร็จลุล่วง ซึ่งได้แก่ คุณกรสุรางค์ จิตรอ่อง คุณกาญจนา ศิริจันทึก คุณปิยะมาศ จานนอก คุณศิริวรรณ ณะวงษ์ และคุณสุชาดา อุดมพร ขอขอบคุณ คุณกุณฑิกา เวชกลาง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์บางส่วนของโครงการวิจัย ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยจัดทำเอกสารการเบิกจ่ายและจัดทำบัญชี และคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณบริษัทอุตสาหกรรมน้ำปลาระยอง ที่อนุเคราะห์ในตัวอย่างน้ำปลาและการเก็บตัวอย่างปลาเพื่อใช้ในการทดลอง

บทคัดย่อ

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสคู่อาหารไทยซึ่งเป็นที่รู้จักแพร่หลาย ในปัจจุบันมีรายงานถึงปริมาณฮีสตามีนที่สูงในน้ำปลา แม้ว่าจะไม่เป็นปัญหาต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรงเนื่องจากปริมาณบริโภคน้ำปลาในแต่ละครั้งค่อนข้างน้อย แต่ปริมาณฮีสตามีนที่สูงแสดงถึงความไม่ถูกสุขลักษณะของผลิตภัณฑ์ และส่งผลกระทบให้ปริมาณส่งออกน้ำปลาลดลง เพื่อให้สามารถควบคุมและลดปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดฮีสตา-มีนในน้ำปลา วัตถุประสงค์โดยรวมของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฮีสตามีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา

ฮีสตามีนในตัวอย่างปลากะตัก (*Stolephorus sp.*) เก็บในน้ำแข็งเพิ่มขึ้นจาก 1 mg/100g เป็น 2 mg/100g ใน 15 วัน ค่าฮีสตามีนเพิ่มเกินกว่า 20 mg/100g เมื่อเก็บที่ 15 และ 35°ซ เกินกว่า 32 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในปลากะตักที่คัดแยกได้ที่ 35°ซ คือ *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, และ *Staphylococcus xylosus* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฮีสติดีนได้สูงถึง 765.9-2,030.2 ppm เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์เจริญได้ดีที่ 0.5% NaCl, pH 5.5 ที่ 35 °ซ แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตและสร้างฮีสตามีนได้ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 20-25%

ปริมาณฮีสตามีนเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง แต่มีค่าเพิ่มขึ้นที่ 40°ซ โดยไม่ขึ้นกับคุณภาพความสดของวัตถุดิบ การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดและแบคทีเรียชอบเค็มของตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ มีลักษณะคล้ายกัน แบคทีเรียสร้างฮีสตามีนที่คัดแยกได้คือ *Staphyloccocus epidermidis* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนได้ 66 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด ไนโตรเจนแอมโมเนีย และ แอลฟา-อะมิโน เพิ่มขึ้นตลอดระยะการหมักทั้งสองอุณหภูมิ การหมักที่ 40°ซ มีอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่าทำให้ได้น้ำปลาภายใน 13 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามน้ำปลาหมักที่ 40°ซ มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยกว่าน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 52 สัปดาห์ ผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่หมักจากปลาเน่าที่อุณหภูมิห้องมีกลิ่นเน่าเหม็น ในขณะที่ตัวอย่างหมักที่ 40°ซ มีคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสไม่ต่างจากน้ำปลาที่หมักจากปลาสด

Abstract

Fish sauce is a well-known condiment for Thai foods. It has recently been reported that fish suace contains high level of histamine. Although this is not a health threat to consumers due to the low serving size, it raises the questions related to sanitary and hygine of the product. Consequently, the exporting value has been suffered. In order to effectively control and minimize the histamine content, the cause of histamine formation must be identified. The overall objective of this study was to investigate the factors affecting histamine formation during fish sauce fermentation.

Histamine of anchovy (*Stolephorus sp.*) kept in ice gradually increased from 1 mg/100g to 2 mg/100g within 15 days. It exceeded 20 mg/100g when stored at 15 and 35°C longer than 32 and 8 h, respectively. Histamine-forming bacteria isolated from spoiled anchovy at 35°C were *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, and *Staphylococcus xylosus*. These bacteria produced histamine in the histidine-enriched broth of 765.9-2,030.2 ppm. The optimum growth conditions of all strains were at 0.5% NaCl, pH 5.5, 35°C. No growth and histamine formation were detected at 20-25% NaCl.

Changes of histamine was subtle during the fermentation at room temperature, but gradually increased at 40°C, regardless of the freshness quality of raw material. Changes of total viable plate count and halobacteria were similar between 2 fermentation temperatures. Histamine-forming bacteria was isolated from fermented samples and identified as *Staphylococcus epidermidis*, which produced histamine of 66 ppm in a histidine-enriched broth. Total nitrogen, ammonical nitrogen, and α-amino content increased at both fermentation temperatures. The rate of protein hydrolysis was higher at 40°C, yielding fish sauce after 13 weeks. However, fish sauce fermented at 40°C contained lower free amino acids than those fermented at room temperature for 52 weeks. Fish sauce made from spoiled fish (16h) fermented at room temperature exhibited the strong fecal odor, while those fermented at 40°C showed the similar sensory characteristics as samples fermented using fresh fish.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ ภาษาไทย	ข
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
ขอบเขตการวิจัย	5
วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีการทดลอง	7
บทที่ 3 ผลการวิจัย	15
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	74
ภาคผนวก ข	74
ภาคผนวก ค	76
ภาคผนวก ง	85
ประวัตินักวิจัย	94

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆที่พบในปลากะตักที่เน่าเสียที่ 35° ซ	21
ตารางที่ 2	แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่สร้างฮีสตามีนในปลากะตักที่เน่าเสีย	24
ตารางที่ 3	คุณภาพทางเคมีของปลาที่สภาวะความสดต่างๆ	35
ตารางที่ 4	แบคทีเรียสร้าง Caseinase จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาทั้งสิ้น 124 ไอโซเลท (ภาคผนวก ง) ด้วยอาหาร Skim milk agar	56
ตารางที่ 5	แบคทีเรียสร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณตั้งแต่ 3 ppm ขึ้นไปจากการทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างจากกระบวนการหมักน้ำปลาทั้งสิ้น 124 ไอโซเลท (ภาคผนวก ง) โดยใช้อาหาร Histamine evaluation broth (HEB)	58
ตารางที่ 6	องค์ประกอบของกรดอะมิโนของน้ำปลาหมักที่สภาวะต่างๆ (mg/100 mL)	62

สารบัญรูปภาพ

		หน้าที่
รูปที่ 1a –c	การเปลี่ยนแปลงค่าฮีสตามีนและ pH (a) ,tolal volatile base-nitrogen (TVB-N)และ trimethylamine (TMA) (b) และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ (c) ของปลากะตักเก็บที่ 0°ซ PCA = plate count agar, BG= violet red bile glucoe agar, TCBS = thiosufate citrate bile salt agar	18
รูปที่ 2a – d	การเปลี่ยนแปลงค่าฮีสตามีนและ pH (a) ,tolal volatile base-nitrogen (TVB-N)(c)และ trimethylamine (d) ของปลากะตักเก็บที่ 15 และ 35°ซ	19
รูปที่ 3a – c	การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย total plate count (a), enteric bacteria (c) ของปลากะตักเก็บที่ 15 และ 35°ซ	20
รูปที่ 4	จำนวนโคโลนีที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้งเชื้อไนเวน(Niven) และจำนวนโคโลนีที่สร้างฮีสตามีน (HFB) ที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	23
รูปที่ 5	ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI	25
รูปที่ 6	ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหารไนเวน	26
รูปที่ 7	ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกจาก VRBG (V2-3-V2-6) และ TCBS (T2-4, T2-10)	27
รูปที่ 8	ผลของอุณหภูมิต่อจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน	28
รูปที่ 9	ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	31
รูปที่ 10	ผลของ pH9 ต่อการสร้างฮีสาตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากปลากะตักเน่า	32
รูปที่ 11	ผลของความเข้มข้นเกลือต่อจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน	33
รูปที่ 12	ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการสร้างฮีสตามีนของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	34
รูปที่ 13a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	36
รูปที่ 14a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	37
รูปที่ 15a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	39

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 16a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	40
รูปที่ 17a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟาอะมิโนในระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	41
รูปที่ 18a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟาอะมิโนในระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	42
รูปที่ 19a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	45
รูปที่ 20a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	46
รูปที่ 21a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่า pH ในระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	47
รูปที่ 22a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่า pH ในระหว่างการะบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	48
รูปที่ 23a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	49
รูปที่ 24a-b	การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	50
รูปที่ 25a-b	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	52
รูปที่ 26a-b	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารไนเวนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	53
รูปที่ 27a-b	การเปลี่ยนแปลงจำนวน Halobacterium ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)	59
รูปที่ 28a-b	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้อง (a)และ	66

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

น้ำปลาเป็นอาหารหมักดองที่บริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศไทยและกำลังได้รับความนิยมทั่วโลก โดยในปี 2541 มีมูลค่าการส่งออก 637.6 ล้านบาท และเพิ่มเป็น 757.6 ล้านบาทในปี 2544 (www.customs.go.th) ปลาที่นิยมนำมาทำน้ำปลา คือ ปลากระตัก (*Stolephorus spp.*) (ไพโรจน์, 2533) ปราณีและคณะ (2538) พบว่า ปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลาที่ผลิตในประเทศไทย 26 ตัวอย่างอยู่ระหว่าง 36.7-1,031.1 ppm โดยน้ำปลา 14 ตัวอย่างมีปริมาณฮีสตามีนเกิน 200 ppm ซึ่งมากกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดโดยประเทศคู่ค้า เช่น ในประเทศแคนาดาได้กำหนดปริมาณสูงสุดของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลากระป๋อง และผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักดองสำหรับนำเข้าเป็น 100 และ 200 ppm ตามลำดับ (NIPC, 1993)ปริมาณฮีสตามีนที่สูงในน้ำปลานั้นอาจไม่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษแก่ผู้บริโภค เนื่องจากปริมาณการบริโภคค่อนข้างน้อยคือโดยเฉลี่ย 23.5 กรัมต่อคนต่อวัน (อมรา, 2533) แต่ปริมาณฮีสตามีนที่เกินค่ามาตรฐานนั้นไม่เป็นที่ยอมรับแก่ผู้ซื้อในประเทศต่างๆ ซึ่งจะส่งผลกระทบให้การขยายตัวของน้ำปลาในตลาดโลกมีข้อจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ควรจะวิจัยหาสาเหตุของการเกิดฮีสตามีนในน้ำปลา เพื่อที่จะหามาตรการควบคุมให้มีปริมาณอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

ปลาเป็นสัตว์น้ำที่เสื่อมสภาพเร็วและเน่าเสียได้ง่ายโดยธรรมชาติ เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ในตัวปลาและจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน โปรตีนจะถูกย่อยสลายให้มีโมเลกุลเล็กลงเป็น เปปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน เอมีน อัลดีไฮด์ และแอมโมเนีย ซึ่งทำให้เกิดกลิ่น รสไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ในปลาบางชนิดที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง เช่น ปลาในวงศ์ *Scombridae* และ *Scomberesocidae* รวมทั้งปลาอื่น ๆ เช่น ปลาซาร์ดีน ทูน่า และแฮริง เป็นต้น จะมีโอกาสปนเปื้อนฮีสตามีนมากกว่าปลาชนิดอื่นๆ เอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Enterobacter aerogenes, Pseudomonas putrefaciens Aeromonas hydrophila, Proteus vulgaris, Clostridium perfringens, Vibrio alginolyticus* (Middlebrooks et al., 1988) และ *Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Hafnia alvei* (Ward, 1994) แบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในลำไส้ เหงือก และผิวของปลา ซึ่งจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 4 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาปลาหลังการจับที่ไม่เหมาะสม เช่นอุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน จะเป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์เหล่านี้ ทำให้ปริมาณฮีสตามีนในปลาเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์และองค์ประกอบทางเคมีของ

ปลากะตักของประเทศไทยหลังการจับจึงยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดว่าควรเก็บรักษาปลาหลังการจับที่อุณหภูมิใดในระยะเวลาเท่าใดเพื่อให้มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางสำหรับการควบคุมปริมาณฮีสตามีนในการผลิตน้ำปลาให้มีปริมาณฮีสตามีนต่ำซึ่งนอกจากวัตถุดิบแล้ว อาจเกิดฮีสตามีนขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำปลา

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบฮีสตามีนในอาหารหมักดองอีกหลายชนิด เช่น เนยแข็ง (cheese) ไวน์ (wine) และกระหล่ำดอง (sauerkraut) เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม lactic acid bacteria และจุลินทรีย์ทนเค็มบางชนิดในผลิตภัณฑ์เหล่านั้นอาจเป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำปลามีผลต่อการเพิ่มของฮีสตามีนหรือไม่อย่างไร องค์ความรู้ดังกล่าวจะนำไปสู่การแก้ไขปัญหาปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลงานที่มีมาก่อน

ฮีสตามีนเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน โดยเอนไซม์ฮีสติดิน ดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) สารฮีสตามีนมักพบในผลิตภัณฑ์ปลา (Malle et al., 1996) และอาหารหมักดอง (Maijala et al., 1995) การปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารสามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค อาการเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมงหลังการบริโภค โดยมีอาการแพ้เป็นผื่นที่คอและหน้า เหงื่อออกมาก ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง (Taylor, 1986) มีรายงานพบมากในประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และ สหราชอาณาจักร ปริมาณฮีสตามีนต่ำ (น้อยกว่า 50 ppm) ถือเป็นสิ่งปกติที่พบได้ในอาหาร ส่วนปริมาณฮีสตามีนที่สูงกว่า 1000 ppm จะทำให้ผู้บริโภคมีอาการอาหารเป็นพิษรุนแรงได้ ฮีสตามีนเป็นสารที่ทนความร้อนสูง ความร้อนที่ใช้ในกระบวนผลิตอาหารไม่สามารถทำลายฮีสตามีนได้ (Gibson, 1995)

การเกิดฮีสตามีนในเนื้อปลา

ปราณีและคณะ (2538) พบว่า น้ำปลาที่ผลิตในประเทศไทยอาจมีปริมาณฮีสตามีนสูงเกิน 1,000 ppm ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ประมงซึ่งมักกำหนดที่ 100 หรือ 200 ppm แล้วแต่ชนิดของผลิตภัณฑ์ (NIPC, 1993) ปริมาณฮีสตามีนที่สูงในน้ำปลาอาจเกิดจากสาเหตุสำคัญ 2 ประการคือ วัตถุดิบที่ใช้คือปลากะตักมีปริมาณฮีสตามีนที่สูง และ/หรือ เกิดฮีสตามีนขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก Veciana-Nogues et al. (1990) พบว่าปริมาณฮีสตามีนและไทรามีน (Tyramin) ในปลา anchovies (*Engraulis encrasicholus*) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเก็บที่ 4-6°ซ และที่อุณหภูมิ 18-22°ซ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของดัชนีบ่งชี้ความสดอื่นๆ คือ trimethylamine, volatile basic nitrogen, hypoxanthine และ pH มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนและเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตา

มีนในปลาหลายชนิด เช่น Okuzumi et al. (1981) พบการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลา mackerel เก็บที่ 5 และ 20°ซ โดยจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychophilic) เป็น แบคทีเรียแกรมลบ มีรูปเซลล์กลมรี (coccobacilli) และต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับ 1-3% ซึ่งต่อมาคณะผู้วิจัยชุดเดียวกันนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวคือ *Morganella morganii, Proteus vulgaris, Hafnia alvei, Citrobacter spp., Vibrio, spp., Aeromonas spp.* โดย *Morganella morganii* สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงที่ 25 และ 30°ซ (Okuzumi et al., 1984) Morii et al. (1988) พบว่า *Photobacterium phosphoreum* อาจมีบทบาทต่อการสร้างฮีสตามีนในปลา mackerel ซึ่งเก็บในน้ำแข็ง และ 10°ซ Ababouch et al. (1991) แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนจากปลาซาร์ดีนที่เก็บในน้ำแข็งและที่อุณหภูมิห้องซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ได้แก่ *Proteus sp., Morganella morganii, Proteus vulgaris, P. mirabilis,* และ *Providencia stuartii* นอกจากนี้ยังพบว่า *M. morganii* และ *Proteus sp.* สามารถสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก sardine fish infusion broth ได้ที่ 4°ซ แต่สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างฮีสตามีน คือ ที่ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 4%, pH 5 และที่ 25°ซ Middlebrooks, et al. (1988) พบการเพิ่มขึ้นของฮีตามีน คาดาเวอรีน (cadaverine) และพิวทรีซีน (putrescine) ในปลา Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) ที่ระยะเวลาการเก็บที่ 0, 15, และ 30°ซ เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถสร้างฮีสตามีนที่ 0°ซ คือ *Acinetobacter lwoffi, Aeromonas hydrophila, Morganella morganii, Pseudomonas fluorescens, P. putrefaciens, Vibrio alginolyticus* จุลินทรีย์สร้างฮีสตามีนที่ 15°ซ คือ *Acinetobacter lwoffi, Aeromonas hydrophila, Clostridium perfringens, Enterobacter aerogenes, Hafnia alvei, M. morganii, Proteus mirabilis, Pseudomonas fluorescens, P. putrefaciens, Vibrio alginolyticus* และจุลินทรีย์สร้างฮีสตามีนที่ 30°ซ คือ *Cl. perfringens, E.aerogenes, H. alvei, M. morganii, P.vulgaris, F. putrefaciens, V. alginolyticus*

Lopez-Sabater et al. (1994) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนในปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) เป็นเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบซึ่งได้แก่ *M. morganii, Klebsiella oxytoca, K. pneumoniae, Enterobacter cloacae, E. aerogenes* โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงกว่า 500 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย *M. morganii* และ *K. oxytoca* สร้างได้สูงถึง 2,728 และ 1,868 ppm ภายใน 18 ชั่วโมง ที่ 37°ซ ตามลำดับ แต่เมื่อนำจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์นี้ไปเติมลง (inoculate) ในเนื้อปลาทูน่าที่ปลอดเชื้อพบว่าปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 150 และ 143 ppm ภายใน 18 ชั่วโมง ที่ 20°ซ ตามลำดับเท่านั้น (Lopez-Sabater et al., 1996) ปริมาณการเพิ่มฮีสตามีนที่น้อยในปลาอาจเนื่องมาจากปริมาณฮีสติดีนที่มีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ในสภาวะความเป็นจริงเมื่อปลาเน่าเสีย จะมีการเจริญ

เติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ psychotroph โดยเฉพาะกลุ่ม pseudomonads หรือ alteromonads ซึ่งสามารถสร้างโปรติเอสทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโน เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีน นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 0°ซ ดังนั้นการเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (0°ซ) จึงเป็นมาตรการในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนและควบคุมปริมาณฮีสตามีนอย่างมีประสิทธิภาพ Kim et al. (2001) ได้ศึกษาในทำนองเดียวกันโดยแยกและคัดเลือกเชื้อ *M. morganii* จากปลาทูน่า albacore แล้วนำไป inoculate ในเนื้อปลา mackerel ปลา albacore ปลา mahi-mahi และ ปลา salmon ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยสารละลาย ethanol-acetone (1:1) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดประมาณ 3,500 ppm ในปลา mackerel ภายใน 24 ชั่วโมงที่ 37°ซ ทั้งนี้เนื่องจากปลา mackerel มีปริมาณฮีสติดีนอิสระสูงกว่าปลาชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่แข็งมีผลให้ *M. morganii* ลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทำละลายที่ 25°ซ จำนวนจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บสามารถเพิ่มจำนวนและสร้างฮีสตามีนได้เช่นเดิม จะเห็นได้ว่ามีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในปลาหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาในปลากะตักในเขตน่านน้ำอ่าวไทยซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลา การทราบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนในปลากะตัก และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง (Pattern) คุณภาพความสดที่อุณหภูมิต่างๆ จะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับควบคุมคุณภาพความสดและปริมาณฮีสตามีนของปลาอย่างมีประสิทธิภาพ

การเกิดฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักดอง

ฮีสตามีนยังพบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองหลายชนิด เช่น เนยแข็ง (Cheese) ไวน์ (wine) และกระหล่ำปลีดอง (sauerkraut) เป็นต้น Roig-sagues et al. (1996) รายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ฮีสติดิน ดีคาร์บอกซิเลส ในไส้กรอกสเปน (Salchichon) คือ แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Klebsiella oxytoca, E. aerogenes, E. cloacae Lactobacillus curvatus* ส่วนแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณฮีสตามีนในเนยแข็งอิตาลี (Italian cheese) คือ *Bacillus macerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนเกลือ (halotolerant) สามารถเจริญได้ดีที่ 30 °ซ และสามารถผลิตฮีสตามีนในช่วงอุณหภูมิ 4-43 °ซ (Rodriguez-Jerez et al., 1994a) Joosten and Nunez (1996) พบว่า nisin ซึ่งเป็นสารที่สร้างจาก *L. lactis* มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. buchneri* และ *L. brevis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสติดิน ดีคาร์บอกซิเลสในเนยแข็ง โดยพบว่าตัวอย่างเนยแข็งที่มี nisin จะมีปริมาณฮีสตามีน น้อยกว่า 10 ppm ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่มี nisin มีปริมาณฮีสตามีนสูงถึง 177-214 ppm นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งแบคทีเรีย bacteriocin ที่สร้างโดย *E. faecalis* มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ lactobacilli ทั้ง 2 ชนิด และสามารถควบคุมปริมาณฮีสตา

มีนในเนยแข็งให้มีระดับต่ำกว่า 10 ppm เช่นกัน ส่วนฮีสตามีนในไวน์เกิดจาก *Leuconostoc oenos* ซึ่งเป็น malolactic bacteria ชนิดหนึ่ง (Lonvaud-Funnel and Joyeux, 1994)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการตรวจพบฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิด Rodriguez-Jerez et al. (1994b) พบฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ anchovy ในน้ำมันมะกอก ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง คือ 443.83-3,012.13 ppm เมื่อเก็บที่ 20°ซ และฮีสตามีนมีปริมาณลดลงในผลิตภัณฑ์ anchovy หมักเกลือ ต่อมา Rodriguez-Jerez et al. (1994c) พบเชื้อ *M. morganii* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบเชื้อจุลินทรีย์ทนเค็ม (halotolerant) และจุลินทรีย์ชอบเจริญในที่เค็ม (Halophiles) ในผลิตภัณฑ์ anchovy หมักเกลืออีกด้วย โดยเชื้อ *S. epidermidis* ผลิตฮีสตามีนในช่วง 1.6-1,945 ppm ที่ความเข้มข้นของ NaCl 3-10% และ *S. capitis* ผลิตฮีสตามีนในช่วง 400 ppm ที่ความเข้มข้นของ NaCl 10% (Hernandez-Herrero et al., 1999) Yatsunami and Echigo (1991) พบเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Staphylococcus* ในปลาซาร์ดีนหมักรำข้าว (rice bran pickles of sardine) ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือเข้มข้น 10-12% ได้สูงถึง 1,000 ppm ที่ 37°ซ ภายในระยะเวลา 3 วัน สำหรับในผลิตภัณฑ์น้ำปลานั้น Tanasupawat and Komagata (1995) ได้พบ *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saisithi (1994) ซึ่งสรุปว่าพบ *T. halophilus* จำนวนมากในวันที่ 13 ของการหมักจนกระทั่งเดือนที่ 3 Satomi et al. (1997) พบ *T. muriaticus* sp. nov. จาก fermented squid liver ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่เกลือสูง ต่อมา Kimura et al. (2001) ได้รายงานว่า แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 1,153.4 ppm ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด นอกจากนี้ Tongsanit (1999) พบ *T. halophilius* และ *T. muriaticus* ในน้ำปลาไทย ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถสร้างฮีสตามีนในช่วง 0.36-522.9 ppm อย่างไรก็ตามยังไม่มีการติดตามการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์และปริมาณฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อการศึกษาปัจจัยในด้านความสดของปลากระตัก (*Stolephorus spp.*) และกระบวนการหมักที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลา
2. เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตฮีสตามีนดีคาร์บอกซิเลสในปลากระตัก และระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

ขอบเขตการวิจัย

วัตถุประสงค์โดยรวมของงานวิจัยเพื่อศึกษาผลของความสดของปลาต่อปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยมุ่งเน้นเฉพาะปลากะตัก *(Stolephorus spp.)* นอกจากนี้เพื่อระบุชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในวัตถุดิบระหว่างการหมัก รวมทั้งศึกษาปัจจัยแวดล้อม (ความเข้ม

ข้นของเกลือ ความเป็นกรด – ด่าง และอุณหภูมิ) ที่เหมาะสมต่อการผลิตฮีสตามีนของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เกี่ยวข้อง เพื่อหามาตรการในการผลิตน้ำปลาที่ปริมาณฮีสตามีนต่ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ศึกษาการเกิดฮีสตามีนในปลากะตัก (*Stolephorus sp.*) ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำปลสของประเทศไทย ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ของตัวอย่างปลากะตักเก็บในน้ำแข็ง, 15, and 35°ซ โดยวิเคราะห์ค่า Total volatile base-nitrogen (TVB-N), trimethylamine (TMA) และ pH และวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมด แบคทีเรียในกลุ่ม enteric bacteria และ vibrios จากนั้นคัดแยกและระบุสายพันธุ์ที่สร้างฮีสตามีนในปลากะตัก นอกจากนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างฮีสตามีนของสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาในระดับห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง (27-30°ซ) และที่ 40°ซ โดยแปรระดับความสดของวัตถุดิบ 3 ระดับคือปลาสด ปลาสดปานกลาง (ทิ้งไว้ที่ 35°ซ 8 ชั่วโมง) และปลาเน่า (ทิ้งไว้ที่ 35°ซ 16 ชั่วโมง) เพื่อศึกษาผลของวัตถุดิบต่อการเกิดฮีสตามีนในน้ำปลา วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด แอมโมเนียไนโตรเจน แอลฟา-อะมิโน ฮีสตามีน ค่า pH และสี ตลอดระยะเวลาการหมัก นอกจากนี้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียที่คาดว่าจะสร้างฮีสตามีน แบคทีเรียชอบเค็มและ enteric bacteria วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โดยวิธีพรรณนาเชิงปริมาณ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบสาเหตุของการเกิดฮีสตามีนในน้ำปลา ซึ่งสามารถหาแนวทางแก้ไขเพื่อให้ปริมาณ ฮีสตามีนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานอันเป็นที่ยอมรับแก่ประเทศคู่ค้า งานวิจัยนี้ยังเป็นกรณีตัวอย่างสำหรับการศึกษาปริมาณฮีสตามีนในอาหารหมักดองของไทยชนิดอื่นๆ ที่มีปัญหาจากการปนเปื้อนฮีสตามีนและยังเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปชนิดอื่นๆ ซึ่งประเทศไทยมีการส่งออกนับเป็นมูลค่าจำนวนมาก

หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ ผู้ผลิตน้ำปลาเพื่อการส่งออก ตลอดจนหน่วยงานอื่นๆของรัฐและเอกชนที่สนใจ

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างปลากะตักและสารเคมี

เก็บตัวอย่างปลากะตักที่จับในเขตจังหวัดชลบุรี และระยอง โดยเก็บปลาในน้ำแข็งหลังจากจับทันทีในกล่องโฟม ขนส่งเข้าฝั่งภายใน 6 ชั่วโมงหลังการจับ จากนั้นเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมาทันที

สารเคมี Histamine dihydrochloride, histidine monohydrochloride, leucocrystal violet, porcine kidney diamine oxidase, horse radish peroxidase, *o*-phthaldialdehyde, Dowex 1-X8 จากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ส่วน Trimethylamine hydrochloride and histidine dihydrochloride จากบริษัท Fluka (Switzerland)

อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA), violet red bile glucose agar (VRBG), pseudomonas isolation agar (PI) และ thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS) จากบริษัท Difco Laboratories (Detroit, Mich)

2. ผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในปลากะตัก

เก็บตัวอย่างปลากะตักที่ 0°ซ (บรรจุในกล่องโฟมน้ำแข็งโดยเก็บกล่องโฟมที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 7 °ซ และเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งทุก 12 ชั่วโมง) และเก็บในตู้บ่มที่ 15 และ 35°ซ สุ่มตัวอย่างปลาในแต่ละอุณหภูมิที่แต่ละช่วงเวลาเพื่อตรวจวัดค่า pH, total volatile-base nitrogen (TVB-N), trimethylamine (TMA) ฮีสตามีน จุลินทรีย์รวมทั้งหมด (total plate count) แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และแบคทีเรียในกลุ่ม vibrios

2.1 pH

บดตัวอย่างปลา 10 กรัม กับ deionized water 90 ml ด้วย homogenizer (Nissei AM-8, Nihonseiki kaisha, LTD., Japan) เป็นเวลา 1 นาที แล้ววัดค่า pH ทันที

2.2 Total volatile base nitrogen (TVB-N)

ชั่งตัวอย่างปลา 10 กรัม เติม magnesium oxide 2.00 กรัม เติม silicone antifoam solution 2-3 หยด และน้ำกลั่น 40 ml นำไปกลั่นสารระเหยไนโตรเจนเป็นเวลา 5 นาที (Vapordest 30, Gerhardt, Germany) โดยใช้สารละลาย Boric acid เข้มข้น 4% ปริมาตร 25 ml เพื่อดักจับสารระเหยไนโตรเจน คำนวณปริมาณไนโตรเจนโดยการไทเทรตด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น 0.1 N

2.3 Trimethylamine

บดตัวอย่างปลา 20 กรัม ใน trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 7.5% (w/v) ที่แช่เย็น 80 ml ด้วย homogenizer (Nissei AM-8 Homogenizer, Nihonseiki kaisha, LTD., Japan) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm, 4°ซ (PK 121R, ALC International Srl, Italy) เป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปสกัดด้วย toluene แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ picric acid เข้มข้น 1% วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร คำนวณปริมาณเทียบกับสารละลาย trimethylamine มาตรฐาน ตามวิธีของ AOAC (1995)

2.4 ฮีสตามีน

บดตัวอย่างปลา 20 กรัม ในเมทธานอลปริมาตร 70 ml ด้วย homogenizer (Nissei AM-8,Nihonseiki kaisha, LTD., Japan) นำไปบ่มที่ 60°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยเมทธานอล กรองแยกสารละลายส่วนใส เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Dowex ตามวิธี AOAC (1995) จากนั้นนำฮีสตามีนที่ elute จากคอลัมน์ไปทำปฏิกิริยากับ *o*-phthaldialdehyde แล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสงที่ excitation และ emission wavelengh ที่ 350 และ 444 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrofluorometer (RF-1501, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)

2.5 การตรวจนับจุลินทรีย์

ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดโดยใช้อาหาร Plate count agar (PCA) ตรวจนับจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteria โดยใช้ Violet red bile glucose (VRBG) agar (Difco, USA) และตรวจนับจุลินทรีย์ในกลุ่ม Vibrio โดยใช้ Thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS) (Difco, USA) โดยดำเนินการตามวิธีนับมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา (AOAC International, 1998) และใช้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ตามระบุข้างต้น และใช้ตัวอย่างปลาปริมาณ 50 กรัม เจือจางใน Phosphate buffer (pH 7.0) ปลอดเชื้อ ด้วยวิธี Serial dilution และเกลี่ย suspension ของเชื้อบนผิวหน้าอาหารวุ้นด้วย Spread plate technique ทำการทดลองสองซ้ำ สำหรับตัวอย่างปลาซึ่งเก็บที่ 35°ซ. ตรวจนับจุลินทรีย์ในกลุ่ม Mesophiles โดยบ่มให้จุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 35°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างปลาซึ่งเก็บที่ 0 และ 15°ซ. ตรวจนับจำนวน Psychrotrophs โดยบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 15°ซ. เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร บันทึกค่า CFU (Colony forming unit) โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

3. การแยก (Isolation) และระบุชนิด (Identification) จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนซึ่งพบในปลากะตัก

3.1 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีน

บ่มตัวอย่างปลากะตักสดที่ 35°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จนปลาเน่าเสีย แบ่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนโดยวิธี spectrofluorometric ตามในข้อ 2.4 และแยกและเลือกจุลินทรีย์โดยเน้นกลุ่มของแบคทีเรียตามที่มีรายงานเกี่ยวกับบทบาทในการสร้างฮีสตามีนจากปลากะตัก โดยใช้วิธีการคัดเลือก 2 ขั้นตอน (Kim et al., 2001) ซึ่งเริ่มต้นการแยกจุลินทรีย์โดยใช้ selective media คือ VRBG, TCBS, Pseudomonas isolation agar (P1) (Difco, USA) และ Halobacterium medium (HM) (Athas and Parks, 1997; ภาคผนวก ค 5) เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacter, Vibrios, Pseudomonad และ Halophilic bacteria (Halotolerants และ Moderately halophilic bacteria) ตามลำดับ ตรวจนับจำนวนโคโลนีบน selective media และจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดบน PCA เลือกโคโลนีของแบคทีเรียบน selective media ตามลักษณะทางสัณฐาน (morphological characteristics) ของโคโลนีที่แตกต่างกัน เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้อาหาร Tryptic soy agar (TSA) (Difco, USA) สำหรับ Enterobacteria, Vibrios และ Pseudomonads ใช้ Halobacterium medium สำหรับ Halophilic bacteria จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีบน TSA slant และ Halobacterium medium ตามกลุ่มของแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของจุลินทรีย์ต่อไป

การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส โดยนำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงอยู่บน TSA slant มาเลี้ยงใน TSB ที่อุณหภูมิ 35°ซ. เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นนำมา streak บน TSA และบ่มที่ 35°ซ. เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยว streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven (ภาคผนวก ค 10) (Niven, et al., 1981) จากนั้นบ่มให้จุลินทรีย์เจริญที่ 35°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โคโลนีซึ่งเกิดวงแหวน (halo) สีม่วงล้อมรอบจัดเป็นโคโลนีซึ่งมีแนวโน้มในการสร้างฮีสตามีน

ยืนยันผลการสร้างฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสของแบคทีเรียที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven โดยนำแบคทีเรียนั้นมากระตุ้นใน TSA ที่ 35°ซ. เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรีย 1 loopful ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Histamine evaluation broth (HEB, ภาคผนวก ค 6) บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 35°ซ. เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกจุลินทรีย์ออกที่ 13,000 rpm (Eppendorff, AG, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบปริมาณฮีสตามีนด้วยวิธีทางเอนไซม์ ตามวิธีของ Rodriguez-Jerez et al. (1994) โดยผสมสารละลายส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 M (pH 6.8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, diamine oxidase (0.35 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร, peroxidase (17.5 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ leucocrystal violet ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

บ่มสารละลายผสมที่ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 596 นาโนเมตร โดยใช้อาหาร HEB เป็น blank คำนวณปริมาณฮีสตามีนเทียบกับสารละลายฮีสตามีนมาตรฐาน คัดเลือกไอโซเลท (Isolate) ของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในปริมาณสูงเพื่อระบุชนิดต่อไป

3.2 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีน

เนื่องจากจุลินทรีย์เป้าหมายเป็นแบคทีเรียหลายกลุ่ม การระบุชนิดของแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ตาม Krieg et al. (1984), Sneath et al. (1986), Holt et al. (1994) และ AOAC International (1998) โดยนำจุลินทรีย์ซึ่งทดสอบโดยวิธีข้างต้นแล้วว่าสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูง (Strong histamine Forming bacteria) มาลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรมของเซลล์ โดยเตรียมรอย smear ของแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้น บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน แล้วหยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก1) ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบาๆ ล้างน้ำออกด้วย Gram's iodine (ภาคผนวก ข3) และหยด Gram's iodine ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที เท Gram's iodine ทิ้ง และล้างรอย smear ด้วยแอลกอฮอล์ (95%) หรือ Acetone alcohol (ภาคผนวก ข 1) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมาแต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย smear ด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก2) เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง แล้วตรวจดูรูปร่าง โครงสร้าง (เช่น สปอร์) และการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) และวัดขนาดของเซลล์ด้วย Ocular micrometer ซึ่งได้เทียบค่าแล้วจาก Stage micrometer

สำหรับการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกนั้น โดยทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ดังนี้

1) การสร้างเอนไซม์ Catalase โดยใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA หรือ Halobacterium medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ข2) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้บนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูการเกิดฟองก๊าซ ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Catalase

2) การสร้างเอนไซม์ Oxidase โดยวางแผ่นกระดาษกรองลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ข5) ลงบนกระดาษกรองให้พอเปียก ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือ Halobacterium medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง- 5วัน ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ โดยขีดลากให้เป็นเส้นยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ตรวจดูการเปลี่ยนสีของเชื้อที่

ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Oxidase เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

3) การสร้างเอนไซม์ Lipase โดยใช้อาหาร Tween-80 agar (ภาคผนวก ค27) แล้วตรวจสอบการเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ภายหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญ

4) การสร้างเอนไซม์ Caseinase โดยใช้อาหาร Skim milk agar (ภาคผนวก ค19) แล้วตรวจสอบบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ภายหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญ

5) การย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) โดยใช้อาหาร Starch agar (ภาคผนวก ค20) แล้วตรวจสอบบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ เมื่อหยดน้ำยาไอโอดีนลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญ

6) การย่อยเจลาติน (Gelatin hydrolysis) โดยใช้อาหาร Nutrient gelatin (ภาคผนวก ค16) แล้วตรวจสอบการเหลวเหลวของอาหารที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ ภายหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญ

7) การทดสอบ Oxidation-Fermentation (O-F test) โดยใช้ Glucose O-F medium (ภาคผนวก ค30) บรรจุในหลอดทดสอบ และทดลองควบคู่ทั้งหลอดที่ปิดทับผิวหน้าอาหารด้วย Paraffin ปลอดเชื้อ และไม่ปิดทับผิวหน้าอาหาร ภายหลังการใส่เชื้อ (Inoculate) จากนั้นบ่มให้เชื้อเจริญและตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดแก๊ส

8) ความสามารถในการสร้างกรดและแก๊สจากการใช้น้ำตาลกลูโคสและแลคโทส โดยใช้ Carbohydrate fermentation medium (ภาคผนวก ค5) ที่เติมน้ำตาลกลูโคสหรือแลคโทส และมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube)

9) ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) โดยใช้ Motility test medium (ภาคผนวก ค14) และใส่เชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรง (Needle) เขี่ยเชื้อแล้วแทง (Stab) ลงในอาหาร จากนั้นตรวจสอบการกระจายของเชื้อจากรอย Stab ไปในอาหาร ภายหลังจากที่จุลินทรีย์มีการเจริญ

10) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (4, 10, 20, 30, 35, 40 และ 45°ซ.) โดยใช้อาหาร TSA หรือ Halobacterium medium ตามกลุ่มของแบคที่เรียที่นำมาทดสอบ

11) ความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่างๆ (0, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 3.5, 6.5, 7.0, 12.0 และ 20.0%) โดยใช้อาหาร TSA หรือ Halobacterium medium ตามกลุ่มของแบคที่เรียที่นำมาทดสอบ

จากนั้นจัดจำแนกกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ Non-fastidious Gram-negative rod เพื่อนำมาระบุชนิดโดยใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี API-20E (BIO-Merieux, Marcy-l'Etoile, France)

และกลุ่ม Staphylococci และ Micrococci เพื่อนำมาระบุชนิดโดยใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีAPI-Staph (BIO-Merieux)

3.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างฮีสตามีนของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงซึ่งระบุสายพันธุ์แน่ชัดแล้วมาทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ HBE ที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.5, 5, 10, 20, 25% ที่ pH 5, 5.7, 6.5, 7 และที่อุณหภูมิ 0, 15, 25, 35, 45, 55°ซ โดย streak เชื้อบน TSA แล้วเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum)โดยนำ 1 โคโลนีไปบ่มใน TSB ที่ 35°ซ เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แล้วปรับจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ Inoculum ใน TSB ให้ได้จำนวนเซลล์ 10 ^{8}/มิลลิลิตรมิลลิลิตร ปิเปต inoculum ที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมลงใน HBE ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มตามสภาวะข้างต้น บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในทุกสภาวะ ส่วนที่ความเข้มข้นเกลือ 20-25% บ่มเป็นเวลา 7 วัน ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดด้วยวิธีนับมาตรฐานทางจุลชีววิทยา และใช้อาหาร PCA จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกจุลินทรีย์ออกที่ 13,000 rpm (Eppendorff AG, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบปริมาณฮีสตามีนด้วยวิธี spectrofluorometric (AOAC, 1995)

4. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาในห้องปฏิบัติการ

4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำปลาและการหมักน้ำปลา

นำปลากะตักสดซึ่งจับและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีตามวิธีการข้างต้น แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือปลาสด กลุ่มที่ 2 บ่มปลาสดไว้ที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเน่าเสียปานกลาง กลุ่มที่ 3 บ่มปลาสดไว้ที่ 35°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเน่าเสียมาก วิเคราะห์คุณภาพความสดและจำนวนจุลินทรีย์ จากนั้นหมักปลาทั้ง 3 กลุ่มมาใช้หมักน้ำปลา โดยทดลองหมักที่อุณภูมิสองระดับ คือ ที่อุณหภูมิห้อง และ 40°ซ. โดยเตรียมตัวอย่างปลาเพื่อการหมักเช่นเดียวกันดังนี้ คลุกเคล้าปลากับเกลือสมุทรซึ่งใช้ในโรงงานน้ำปลาในอัตราส่วนปลาต่อเกลือ 7:3 คลุกเคล้าปลาและเกลือให้ทั่วกัน บรรจุปลาหมักเกลือ 5 กิโลกรัมลงในขวดโหลแก้วปริมาตร 6 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง = 16.8× 26.7 cm) ปิดปากขวดโหลด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องและตู้บ่มที่ 40°ซ สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์และในแต่ละช่วงเวลาการหมักจนครบระยะเวลา 70 วันและ 1 ปีสำหรับตัวอย่างหมักที่ 40°ซ และที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำโดยใช้ปลาต่าง จากชุดการทดลอง กัน

4.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของน้ำปลาระหว่างกระบวนการหมักในช่วงระยะเวลาต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.2.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

4.2.2 ไตรเมทธิลเอมีน (Trimethylamine, TMA)

ผสมน้ำปลาตัวอย่างที่กรองแยกกากแล้ว กับสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 7.5% (w/v) ในอัตราส่วน 1:4 ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ที่ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณของ TMA ในสารละลายส่วนใสดังในข้อ 2.3

4.2.3 ฮีสตามีน (Histamine)

ผสมน้ำปลาตัวอย่างที่กรองแยกกากแล้ว 1 ml กับเมทธานอล 9 mL ในขวดวัดปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 60°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วยเมทธานอล นำไปวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนตามรายละเอียดในข้อ 2.4

4.2.4 ไนโตรเจนรวมทั้งหมด (Total nitrogen)

ไปเปตน้ำปลาที่กรองแล้ว 1 ml วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดตามวิธี AOAC ด้วยเครื่องย่อย (digestion unit) (Kjeldhtherm, Gerhardt, Germany) และเครื่องกลั่น (Kjeldahl distillation unit) (Vapordest 30, Gerhardt, Germany)

4.2.5 แอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonical nitrogen)

เจือจางน้ำปลา 20 เท่าด้วยน้ำกลั่น (1:19) ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 20 ml เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 1.5 g เติมน้ำกลั่น 40 ml นำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น (Vapordest 30, Gerhardt, Germany) เป็นเวลา 5 นาที ดักจับสารระเหยไนโตรเจนด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4% (w/v) คำนวณปริมาณไนโตรเจนโดยไทเทรตกับสารละลายกรด HCl เข้มข้น 0.02 N

4.2.6 ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโนที่ละลายได้ (soluble α-amino content)

วิเคราะห์ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโนที่ละลายได้ตามวิธีของ Field (1972) ผสมน้ำปลาที่กรองแล้วกับสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้น 1% (w/v)ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้ความเข้มข้นไม่เกินสารละลายมาตรฐาน *leucine* เข้มข้น 10 mM ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 µl ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2125 M (pH 8.2) ปริมาตร 1 ml เติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 50°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรด

ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 50°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรด HCl เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 2 ml ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกรดอะมิโนในรูปหมู่แอลฟาอะมิโนที่ละลายได้ โดยเทียบกับสารละลายกรดอะมิโน leucine

4.2.7 ค่าสี

ติดตามการเกิดสีน้ำตาลอมแดงของน้ำปลาในระหว่างกระบวนการหมักโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm โดยเจือจางตัวอย่างน้ำปลาที่กรองได้กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-VIS 916, GBC PTY, Ltd., Melbourne, Australia) โดยใช้น้ำกลั่นตั้งค่าศูนย์

4.3 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

ติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ดังนี้ แบคทีเรียพวกที่ทนเค็มและชอบเจริญในที่เค็ม(Haloterants และ Halophiles) กลุ่มที่มีแนวโน้มว่าสร้างฮีสตามีน(Presumptive histamine-forming bacteria) กลุ่ม Enterobacteria และกลุ่ม Vibrios โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Halobacterium medium, Niven medium, VRBG และ TCBS ตามลำดับ คัดเลือกโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ข้างต้นเพื่อนำมาศึกษาถึงความสามารถในการสร้างฮีสตามีนโดยใช้ HEB และวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนด้วยวิธีทางเอนไซม์ (Rodriguez-Jerez et al., 1994) วัดการเจริญของจุลินทรีย์ใน HEB โดยการวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร และเทียบค่าจำนวนเซลล์จากการตรวจนับโดยใช้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ตามวิธีมาตรฐาน จัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามวิธีการของ Krieg et al. (1984), Sneath et al. (1986) และ Holt et al. (1994)

5. คุณสมบัติทางเคมี จุลินทรีย์ และประสาทสัมผัส ของน้ำปลา

เมื่อครบระยะเวลาการหมักซึ่งสังเกตุจากปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดและปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโนที่ละลายได้ กรองน้ำปลาและบ่มน้ำปลาที่กรองได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน ทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Quantitative Descriptive Ananlysis (QDA) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 10 คน วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acids) โดยใช้ Amino acid analyzer (Biochrom, Phamacia, Sweden) วิเคราะห์จุลินทรีย์รวมทั้งหมด ยีสต์และรา แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ทั้ง Total coliforms และ Fecal coliforms และจุลินทรีย์ก่อโรค (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfrigens*, *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*) ตามวิธีของ Andrews and Messer (1990) และ AOAC International (1998)

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. ผลของอุณหภูมิที่การเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในปลากะตัก

1.1 การเก็บปลากะตักที่อุณหภูมิ 0°ซ

ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อเก็บปลากะตักในน้ำแข็งที่ 0°ซ โดยเพิ่มขึ้นจาก 1 mg/100g เป็น 2 mg/100g ภายใน 15 วัน (รูปที่ 1a) ส่วน pH ค่อนข้างคงที่ ที่ 6.5 ตลอดระยะเวลาการเก็บ (รูปที่ 1a) ปริมาณ TVB-N และ TMA เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆตลอดระยะเวลาการเก็บ (รูปที่ 1b) ส่วนจำนวนเชื้อ จุลินทรีย์รวมทั้งหมด และแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacter และ Vibrios เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เช่นกันและมีจำนวนประมาณ 10^6 CFU/g ในวันที่ 15 ของการเก็บ (รูปที่ 1c) จะเห็นว่าปลากะตักสดมีปริมาณฮีสตามีนต่ำ แม้ว่าปลาที่ใช้ในการทดลองจะเป็นปลาที่จับจากท้องทะเลมากกว่า 24 ชั่วโมงก่อนการทดลองก็ตาม แต่การเก็บในน้ำแข็งหลังการจับสามารถควบคุมปริมาณฮีสตามีนให้ได้ต่ำ การเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนที่ 0°ซ แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ Ryser et al. (1984) พบเชื้อจุลินทรีย์เจริญที่อุณหภูมิต่ำคือ *Pseudomonas fluorescens* และ *P. putida* ในปลาทูน่าซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสร้างฮีสตามีนเพียง 3.2 mg/100 ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Morii et al. (1988) พบว่าแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิต่ำคือ *Vibrio, Aeromonas* และ *Photobacterium* โดยเฉพาะ *Photobacterium phosphoreum* นั้น สามารถเจริญได้ที่ 4°ซ และตรวจพบเมื่อเก็บปลาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 12 วัน แบคทีเรียนี้สามารถสร้างฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนที่อุณหภูมิต่ำได้ (Morii et al., 1988; Fujii et al., 1994; Lakshmanan et al., 2002) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าหลังจากเก็บปลาในน้ำแข็ง (อุณหภูมิ 0 °ซ) เป็นเวลา 15 วัน แต่ฮีสตามีนในปริมาณ 2 mg/100g ถือว่ามีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 5 mg/100g (FDA, 1996)

1.2 การเก็บปลากะตักที่อุณหภูมิ 15 °ซ

ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจาก 1 mg/100g เป็น 6 mg/100g ภายใน 24 ชั่วโมงที่ 15°ซ (รูปที่ 2a) จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 130 mg/100g ภายใน 104 ชั่วโมง หรือประมาณวันที่ 4 ของการเก็บ ค่า pH, TVB-N และ TMA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บ 15 วัน (รูปที่ 2b-d) จำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดเพิ่มขึ้นเกินกว่า 10^6 CFU/g ภายใน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3a) และสูงถึง 10^9 CFU/g ในชั่วโมงที่ 104 ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacter และ Vibrio มีจำนวนประมาณ 10^8 และ 10^6 CFU/g ตามลำดับ(รูปที่3b,c) จะเห็นได้ว่าเมื่อปลาเกิดการเน่าเสียจุลินทรีย์ส่วนใหญ่คือจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteria การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ทำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนปลาเกิดสารประกอบเอมีนและแอมโมเนีย

จึงทำให้ค่า pH, TVB-N และ TMA เพิ่มขึ้น และเมื่อมีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ฮีสติดีนจะถูกเปลี่ยนเป็นฮีสตามีน หากต้องการควบคุมปลากะตักให้มีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่า 20 mg/100g ควรเก็บปลาที่ 15°ซ ไม่เกิน 32 ชั่วโมง (รูปที่ 2a) นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่า pH, TVB-N และ TMA ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อย (รูปที่ 2b-d) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าทั้ง 3 อาจไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นดัชนีบ่งบอกความสดของปลากะตักเมื่อเกิดการเน่าเสียในระดับต่ำกว่า 20 mg/100g ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่าทั้งสามเกิดจากการสะสมของสาร ประกอบจำพวก volatile base ซึ่งจะมีปริมาณสูงเมื่อเกิดการเน่าเสียมากแล้ว

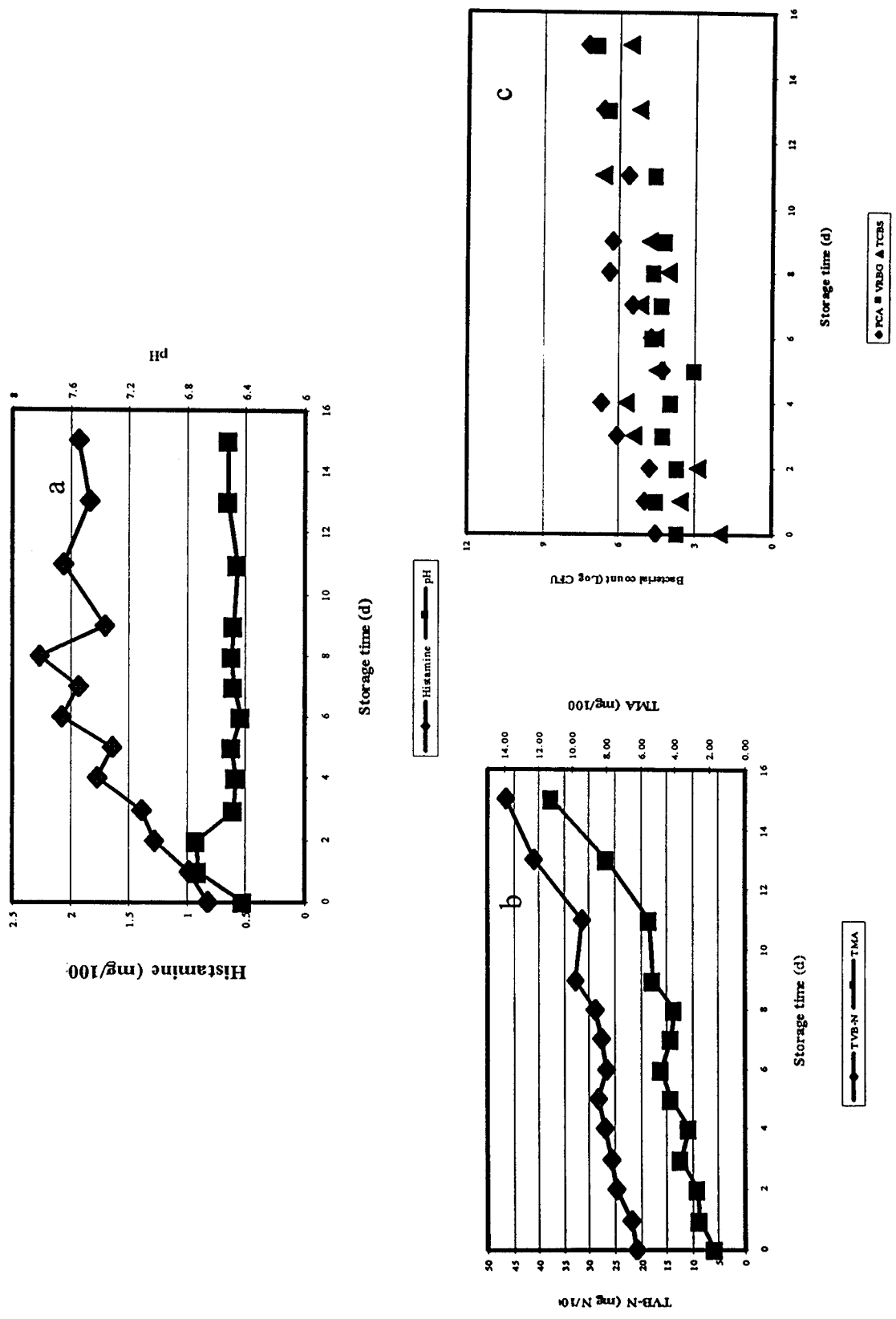
1.3 การเก็บปลากระตักที่อุณหภูมิ 35°ซ

ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บปลาที่ 35°ซ โดยเพิ่มขึ้นมากกว่า 20 mg/100g ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมงและสูงขึ้นเป็น 93.2 mg/100g ภายใน 16 ชั่วโมง (รูปที่ 2a) และยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น โดยมีค่าสูงสุดถึง 132.3 mg/100g ใน 40 ชั่วโมง การเน่าเสียของปลาเริ่มสังเกตเห็นได้ภายใน 16 ชั่วโมง ค่า pH volatile bases และ TMA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บ (รูปที่ 2b-d) อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะเวลาการเก็บ 16 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงของ pH TVB และ TMA เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นสูงมากซึ่งเป็นแนวโน้มเดียวกับที่ 15°ซ จำนวนจุลินทรีย์ทุกกลุ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาการเก็บ 8 ชั่วโมง (รูปที่ 3a-c) โดยจุลินทรีย์รวมทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีจำนวน 10^{10} CFU/g ที่ 64 ชั่วโมง (รูปที่ 3a) ในขณะที่ Enterobacteria และจุลินทรีย์ในกลุ่ม Vibrios มีจำนวนค่อนข้างคงที่ประมาณ 10^6 CFU/g ตลอดระยะเวลาการเก็บ (รูปที่ 3b-c)

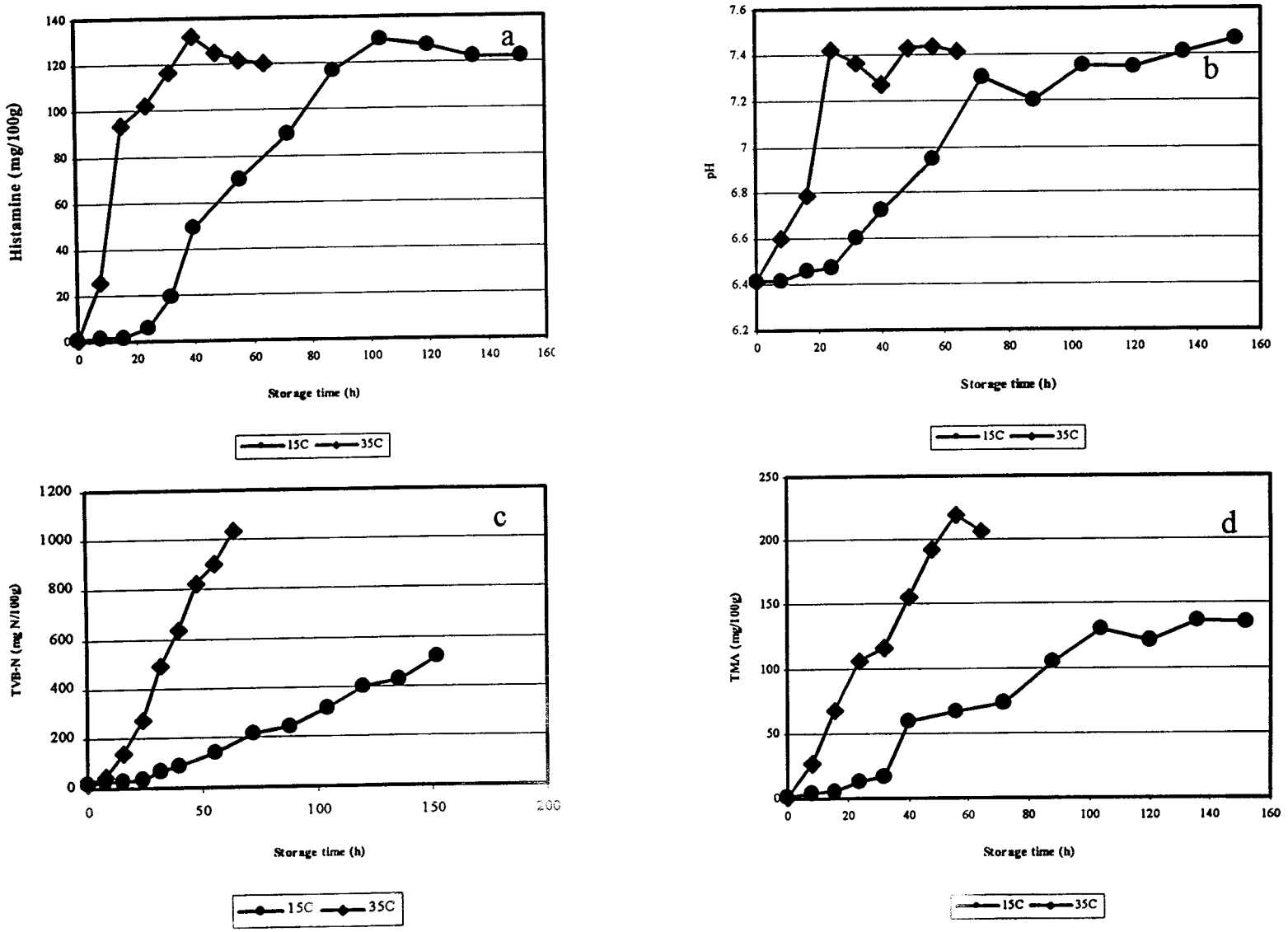
ดังนั้นเพื่อควบคุมฮีสตามีนของปลากระตักให้ต่ำกว่า 20 mg/100g เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำปลานั้นควรเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิต่ำ (< 15°ซ) โดยการเก็บปลาในน้ำแข็งจะสามารถควบคุมให้ปริมาณฮีสตามีนไม่เกิน 5 mg/100g ในระยะเวลา 2 อาทิตย์ ส่วนที่ 15°ซ นั้นสามารถเก็บปลาได้นาน 32 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิกลางแจ้ง (35°ซ) จะทำให้จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนเจริญได้อย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุให้ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งไม่ควรเก็บปลาเกินกว่า 8 ชั่วโมงที่ 35°ซ

ในปลา anchovy *(Engraulis encrasicholus)* เมื่อเก็บที่ 4-6°ซ จะไม่เกิดฮีสตามีนในระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเริ่มเกิดการสะสมของฮีสตามีนหลังจากเก็บเป็นเวลากว่า 73 ชั่วโมง (Veciana-Nogues et al., 1990) ตรวจไม่พบปริมาณฮีสตามีนเมื่อเก็บปลาทูน่าที่ 0°ซ เป็นเวลา 12 วัน แต่ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจนเกินค่ามาตรฐานที่ 50 mg/100g ในวันที่ 18 และเมื่อเก็บที่ 8°ซ ปริมาณฮีสตามีนเกินค่ามาตรฐานในวันที่ 4 (Lopez-Sabater, et al., 1996) Ryder et al. (1984) พบว่าสามารถเก็บปลา jack mackerel *(Trachurus novaezelandiae)* ในน้ำแข็งได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งปกติ K-value เป็นดัชนี

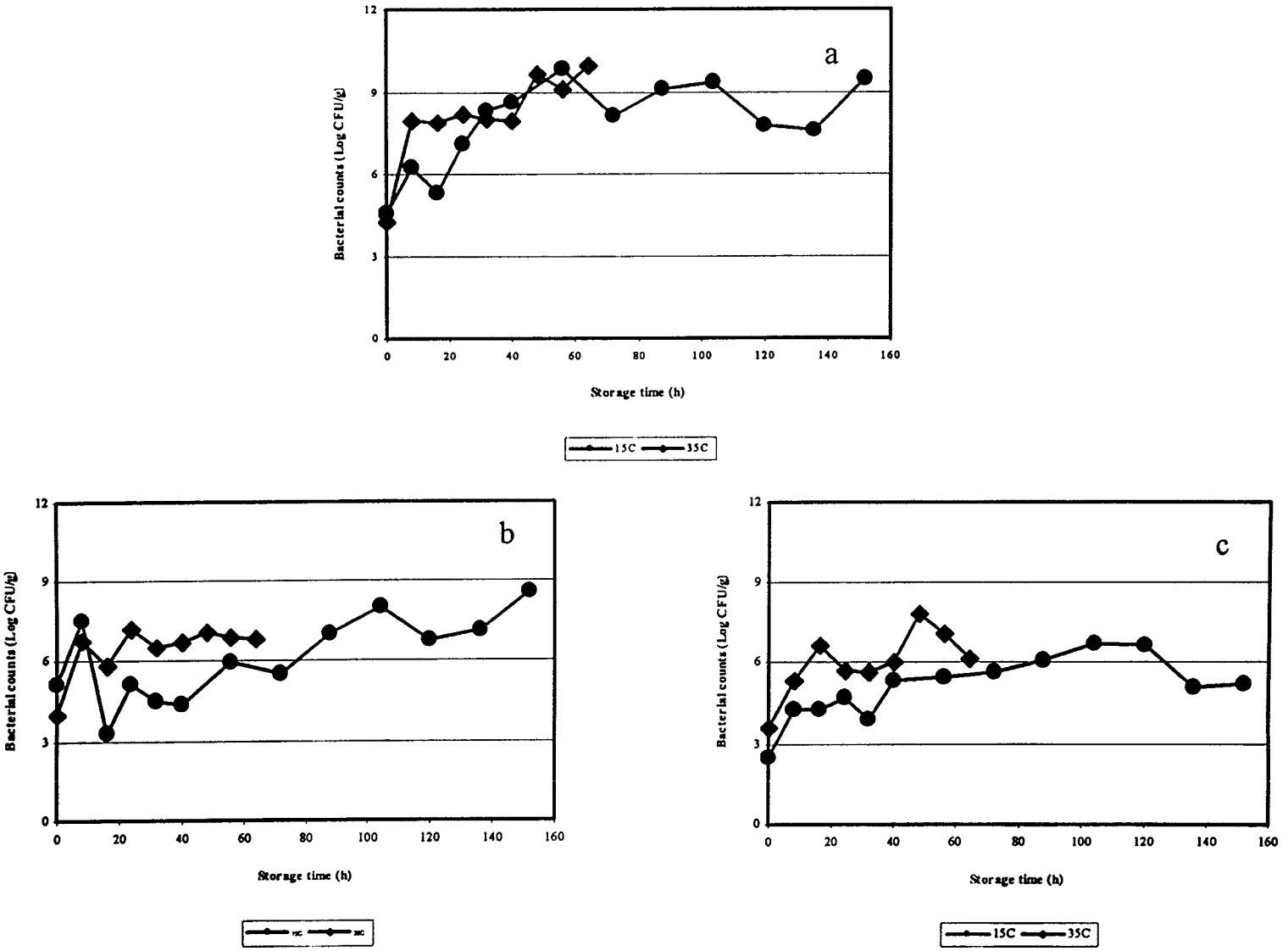
บ่งบอกความสดของปลา jack mackerel ที่ดีในขณะที่ค่า pH, TMA และ TVB-N ไม่สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกความสดที่ดีได้ เนื่องจากค่าดังกล่าวเพิ่มขึ้นหลังจากปลาได้เน่าเสียและมีจำนวนจุลินทรีย์เกิน 10^6 CFU/g แล้ว



รูปที่ 1a-c การเปลี่ยนแปลงค่าฮีสตามีนและ pH (a), total volatile base-nitrogen (TVB-N) และ trimethylamine (TMA) (b) และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ (c) ของปลากะตักเก็บที่ 0°ซ PCA = plate count agar, BG = violet red bile glucoe agar, TCBS = thiosulfate citrate bile salt agar



รูปที่ 2a-d การเปลี่ยนแปลงฮีสตามีน (a) pH (b) total volatile base-nitrogen (TVB-N) (c) และ trimethylamine (d) ของปลากะตักเก็บที่ 15 และ 35°ซ



รูปที่ 3a-c **การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย** total plate count (A), enteric bacteria (b), vibrios (c) **ของปลากะตักเก็บที่** 15 **และ** 35°**ซ**

2. การคัดเลือก (Isolate) และ ระบุชนิด (Identify) จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีน พบในปลากระตัก

ปลาที่ใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนเป็นปลาทำให้เน่าเสียเมื่อเก็บที่ 35°ซ เป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง โดยมีค่าฮีสตามีนสูงถึง 173.2 mg/100g และมีจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1

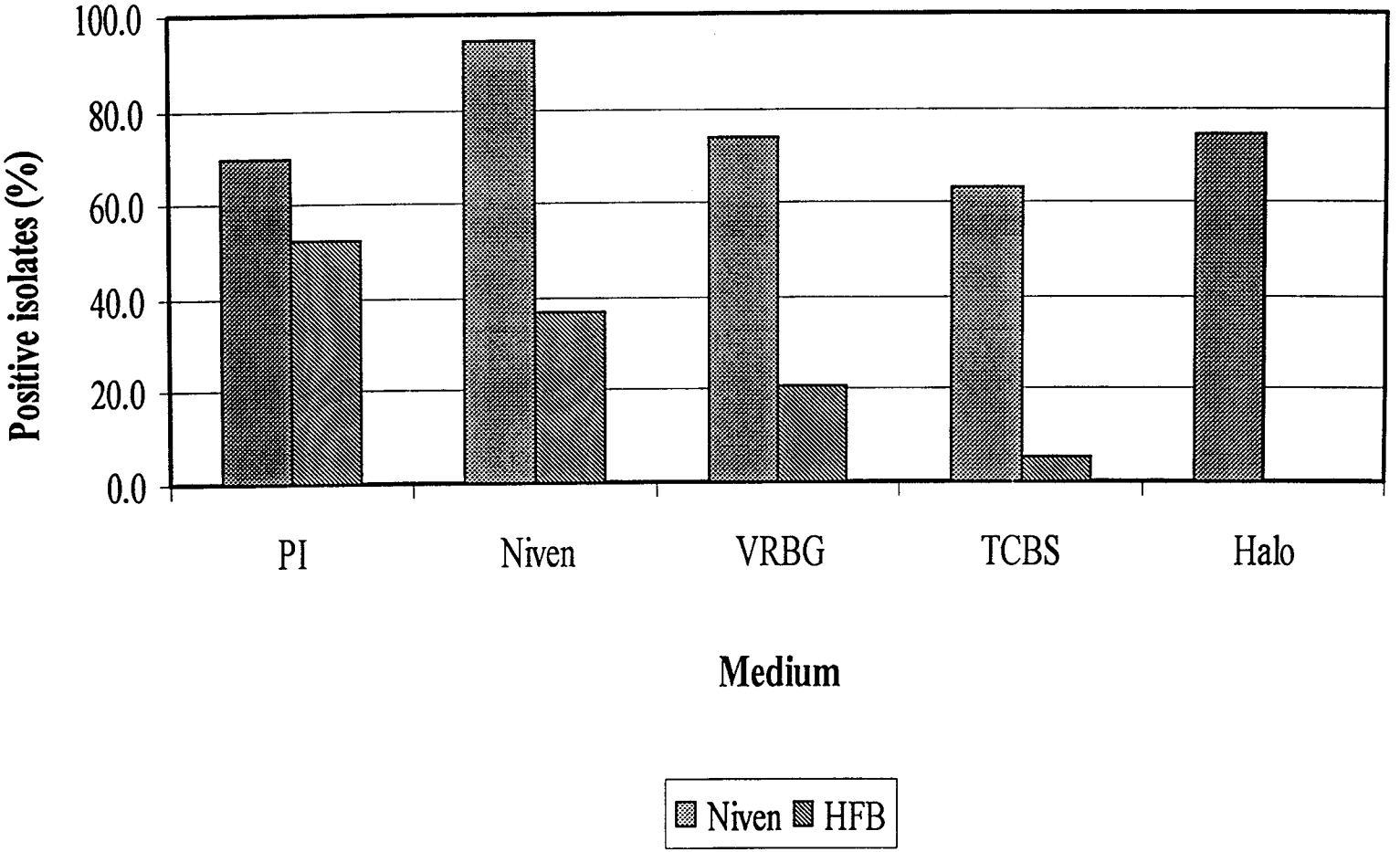
ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆที่พบในปลากะตักที่เน่าเสียที่ 35°ซ

Group of microorganisms	Number of microorganisms (Log CFU/g)
Total plate counts	5.90
Pseudomonds	5.21
Presumptive histamine-forming bacteria	4.43
Enterobacter	5.35
Vibrios	4.83
Holophilic bacteria & Holotolerants	4.67

โดยเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonad และ Enterobacter แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไนเวน (Niven) และเกิดวงแหวนสีม่วงล้อมรอบโคโลนีนั้นเป็นจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะสร้างฮีสตามีน (Presumptive histamine-forming bacteria) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ไม่ได้สร้างฮีสตามีนแต่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงานผ่านวงจรเครบ (Kerb cycle) ก็สามารถผลิตแอมโมเนีย ซึ่งมีความเป็นด่างทำให้เกิดวงแหวนสีม่วงรอบโคโลนีเช่นกัน ดังนั้นโคโลนีสีม่วงที่สังเกตเห็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวนจึงอาจไม่ใช่แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนเสมอไป

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวนสามารถให้ผลบวกที่ผิด (false positive) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน 2 ขั้นตอนโดยใช้ selective media ต่าง ๆ ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวน และยืนยันผลโดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ฮีสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส เมื่อคัดเลือกโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารไนเวน ปรากฏว่าโคโลนีเหล่านั้นให้ผลบวก (วงแหวนสีม่วง) บนอาหารไนเวนประมาณ 63-95% (รูปที่ 4) แต่เมื่อคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ให้ผลบวกเหล่านั้นไปทดสอบกิจกรรมฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส กลับปรากฏว่าจำนวนแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮีสตามีนได้จริงมีเพียง 0-52.2% ของจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกไว้ จากรูปที่ 4 อาหารเลี้ยงเชื้อ PI สามารถใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงสุดคือ 52.2% โคโลนีที่คัดเลือกจากไนเวนเป็นโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้จริงเพียง 37% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการให้ผลบวกที่ผิดของอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวนด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น โคโลนีที่คัดเลือกจากอาหาร VRBG

สามารถสร้างฮีสตามีนได้จริงเพียง 21.1% ส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS สามารถสร้างฮีสตามีนได้จริงเพียง 5.3% ส่วนที่คัดเลือกจาก holobacterium medium ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเค็มและทนเค็มได้ ไม่สามารถสร้างฮีสตามีนได้เลยแม้ว่าจะให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวนถึง 74% (รูปที่ 4) ผลดังกล่าวยืนยันว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวนให้ผลบวกที่ผิดค่อนข้างสูง การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไนเวนอย่างเดียวจึงมีประสิทธิภาพต่ำ (37%) การคัดเลือกแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน แต่การคัดเลือก 2 ขั้นตอนใช้ระยะเวลานาน แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จาก PI สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงกว่า 1,000 ppm มีแบคทีเรียเพียง 3 ไอโซเลท (Isolate) ที่สร้างฮีสตามีนได้ต่ำในช่วง 38-49 ppm (รูปที่ 5) ส่วนไอโซเลทที่คัดเลือกจากอาหารไนเวนโดยส่วนใหญ่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงโดยโคโลนีที่สร้างได้สูงสุดคือ 1,539.5 ppm (รูปที่ 6) แม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBG และ TCBS จะสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้จริงในปริมาณที่น้อย (รูปที่ 4) แต่ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ก็สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูง โดยเฉพาะจาก VRBG นั้นพบไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 2,000 ppm (รูปที่ 7)



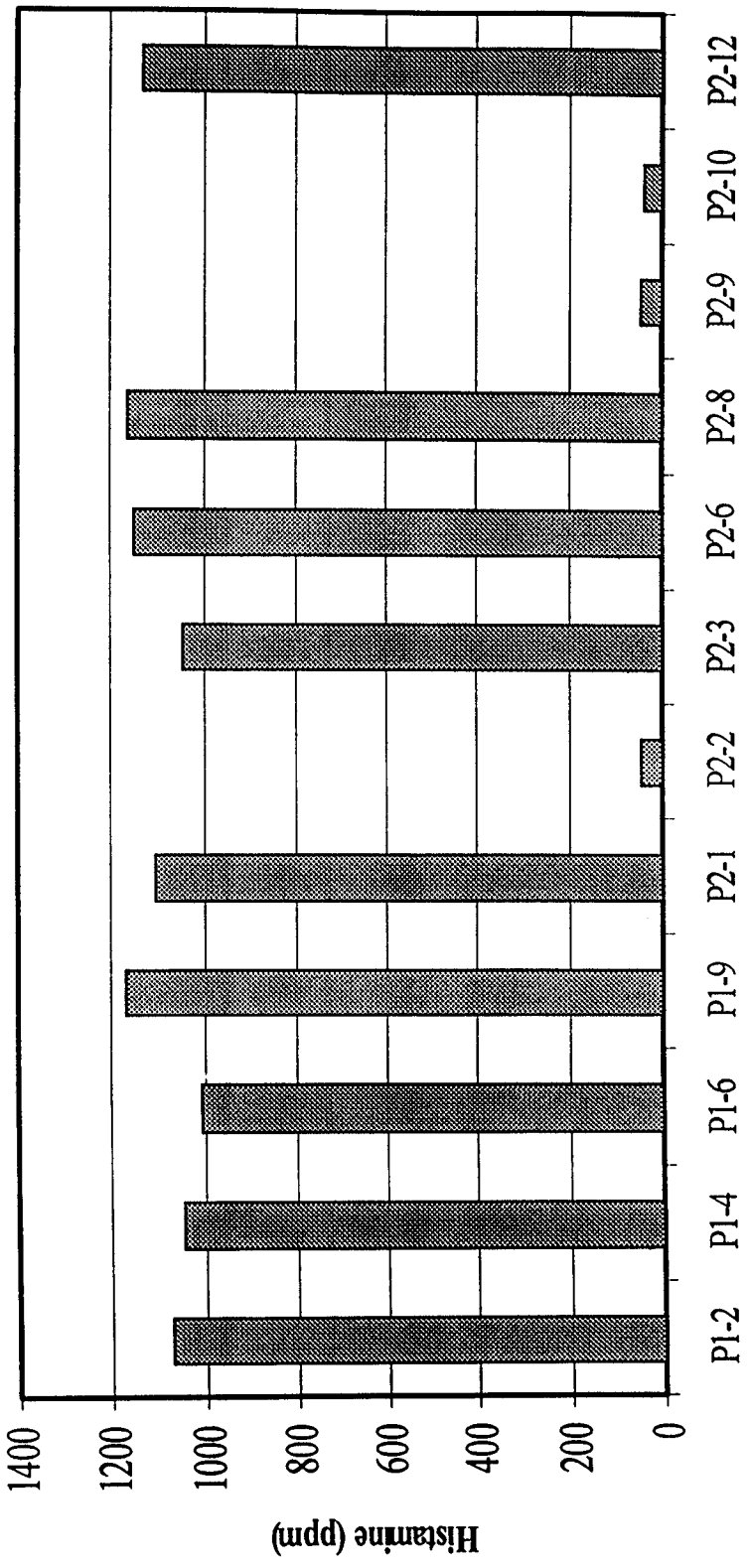
รูปที่ 4 จำนวนโคโลนีที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อไนเวน (Niven) และจำนวนโคโลนีที่สร้างฮีสตามีน (HFB) ที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

เชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงซึ่งแยกและคัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2 นั้น พบว่าแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงในปลากะตักได้แก่ *Morganella morganii, Proteus vulgaris, Enterobacter aerogenes, Staphylococcus xylosus* ส่วน *Citrobacter youngae* และ *E. cloacae* ผลิตฮีสตามีนในปริมาณน้อย จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบคือ *E. aerogenes, E. cloacae, P. vulgaris, C. youngae* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ (family) *Enterobacteriaceae* ซึ่งสามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารและอาหารที่เน่าเสีย Kim et al. (2001) พบเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในปลาทูน่า albacore ที่สร้างฮีสตามีนได้สูงคือ *Morganella morganii, Klebsiella oxytoca, E. aerogenes, C. braakii* และ *Hafnia alvei* โดยพบว่า *M. morganii* สร้างฮีสตามีนได้สูงสุดและคัดเลือกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI เท่านั้น Du et al. (2002) พบว่า *M. morganii, Enterobacter agglomerans, E. intermedium, P. fluorescens, P. vulgaris* และ *Serratia liquefaciens* สามารถสร้างฮีสตามีนในปลาทูน่าครีบเหลือง (yellow fin)

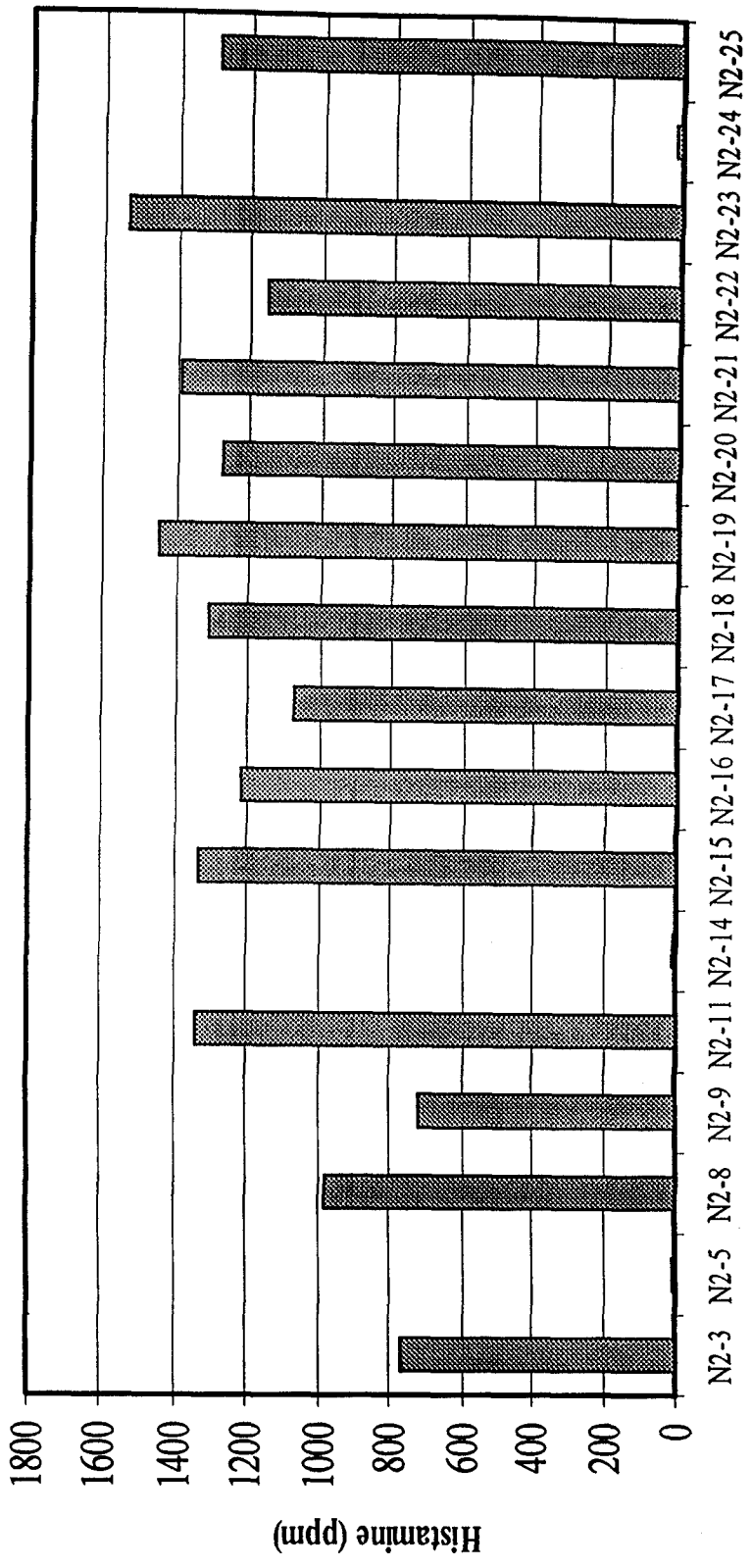
ตารางที่ 2 แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่สร้างฮีสตามีนในปลากะตักที่เน่าเสีย

Isolation medium	Strain	Histamine (ppm)
PI	*Morganella morganii*	1,067.5-1,163.1
	Proteus vulgaris	1,005.7
	Citrobacter youngae	45.5
Niven	*Morganella morganii*	765.9
	Enterobacter aerogenes	1,150.0-1,344.6
	Enterobacter cloacae	13.9
VRBG	*Morganella morganii*	1,335.8-2,030.2
TCBS	*Staphylococcus xylosus*	1,319.4

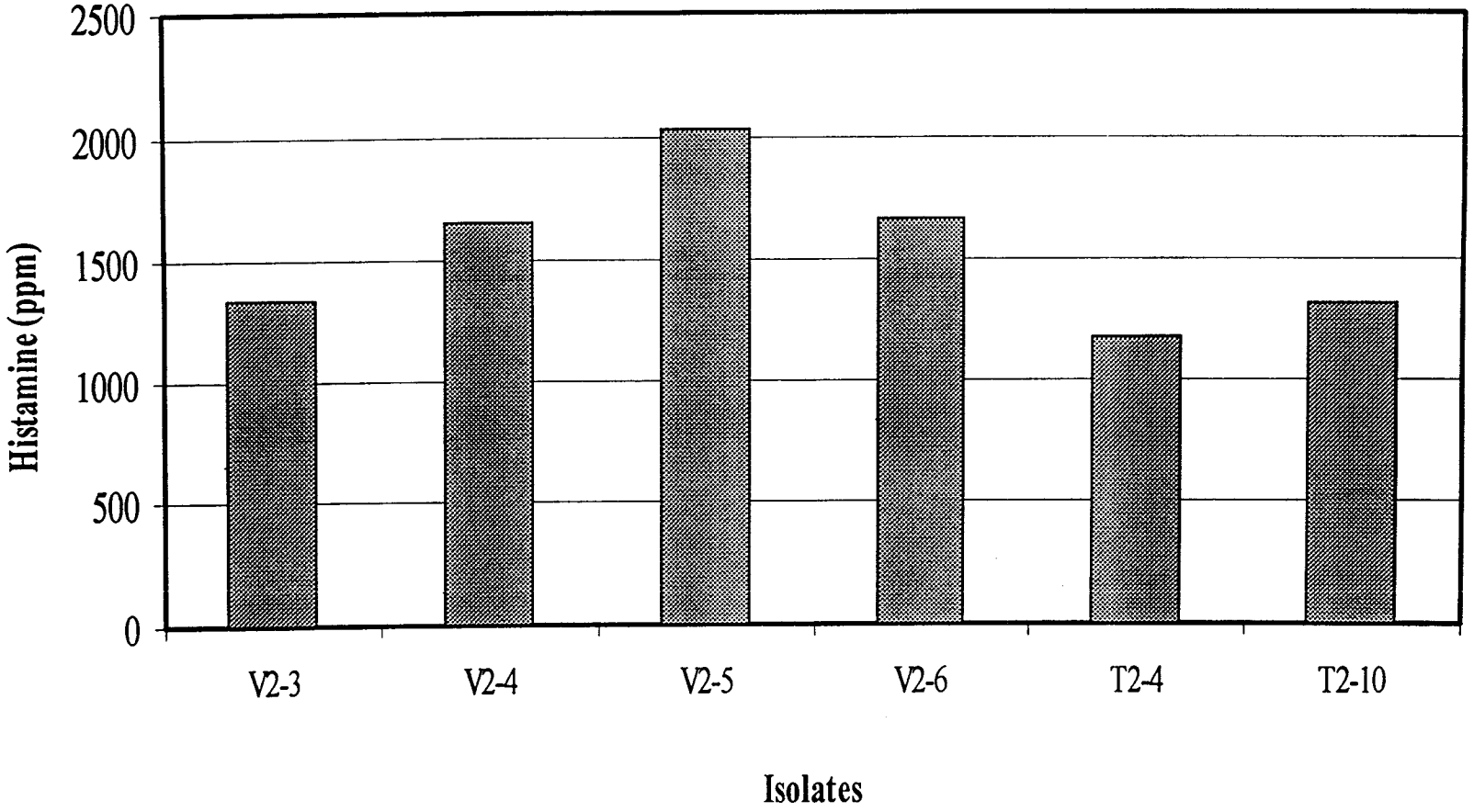
โดยได้แยกและคัดเลือกเชื้อดังกล่าวด้วยอาหารไนเวน นอกจากนี้ยังพบว่า *Morganella morganii* และ *Enterobacter agglomerans,* สามาถผลิตฮีสตามีนได้สูงมากกว่า 300 mg/100g และ 100 mg/100g ภายใน 18 ชั่วโมงที่ 37°ซ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการวิจัยในปลากะตักพบว่า *M. morganii, Proteus vulgaris, Enterobacter aerogenes* และ *Staphylococcus xylosus* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตฮีสตามีนได้สูง และสามารถคัดเลือกเชื้อ *M. morganii* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI, Niven และ VRBG Lopez-Sabater et al. (1994) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจากปลาทูน่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไนเวน ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงได้แก่ *M. morganii, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, E. aerogenes* และ *E. agglomerans*



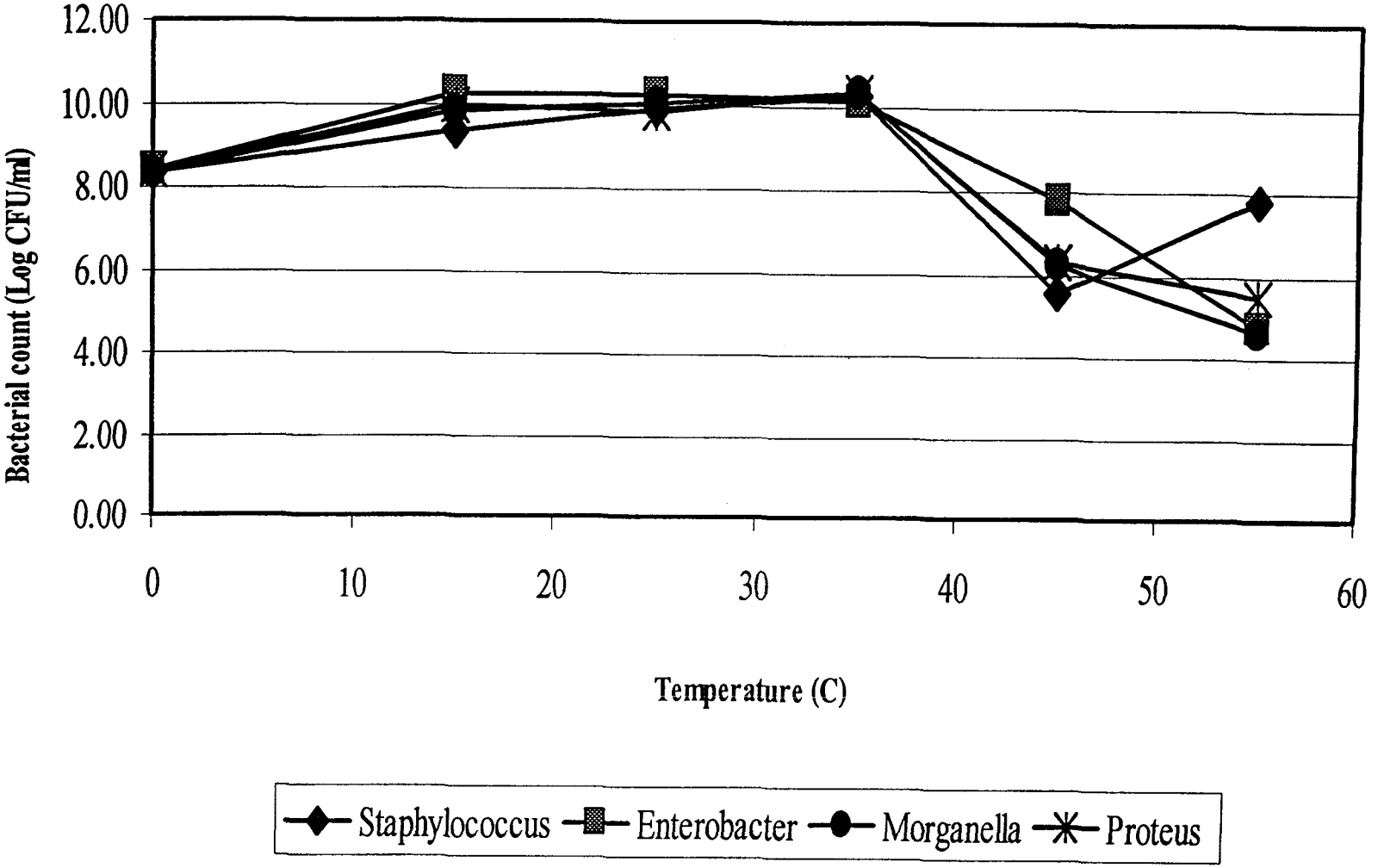
รูปที่ 5 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI



รูปที่ 6 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหารในนวน



รูปที่ 7 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกจาก VRBG (V2-3-V2-6) และ TCBS (T2-4, T2-10)



รูปที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ *Morganella morganii, Proteus vulgaris, Enterobacter aerogenes, Staphylococcus xylosus* แสดงดังรูปที่ 8 จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นของทุกสายพันธุ์คือ 10^7 CFU/ml ซึ่งเมื่อบ่มไว้ที่ 0°ซ เป็นเวลา 7 วันแล้ว จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 10^8 CFU/ml ซึ่งแสดงว่าทุกชนิดที่ศึกษาสามารถเจริญได้ที่ 0°ซ แต่มีอัตราการเจริญต่ำ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 15-35°ซ เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีขึ้น โดยจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 log cycle ภายในเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (45 และ 55°ซ) เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการสร้างฮีสตามีน พบว่าไม่มีการสร้างฮีสตามีนที่ 0°ซ และถึงแม้ปริมาณเชื้อทั้งหมดจะใกล้เคียงกันที่ 15-35 °ซ (รูปที่ 9) แต่ปริมาณฮีสตามีนที่ 15°ซ นั้นน้อยกว่าที่ 25 และ 35°ซ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของฮีสติดีน ดีคาร์บอกซิเลสอยู่ระหว่าง 25-37°ซ (Vaaler and Snell, 1989) เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ *Enterobacter aerogenes* สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดคือ 5,011.2 ppm ที่ 35°ซ ภายใน 18 ชั่วโมง (รูปที่ 9) ดังนั้นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนอาจจะไม่สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงปริมาณฮีสตามีนในอาหารได้อย่างแน่ชัด สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ฮีสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีน ผลดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนสามารถอยู่รอดและเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (0°ซ) ได้ แต่เชื้อเหล่านี้ไม่ใช่สาเหตุของการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนที่ 0°ซ แต่น่าจะเกิดจาก psychrotrophs เช่น *Vibrio, Aeromonas* และ *Photobacterium* (Morii et al., 1988; Fujii et al., 1994; Lakshmanan et al., 2002) ส่วนการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลากะตักเก็บที่ 15°ซ นั้นอาจเป็นการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียเหล่านี้และ psychrotrophs ดังนั้นการเก็บรักษาปลาให้เย็นอยู่ตลอดเวลาก่อนนำมาแปรรูปจึงเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของ วัตุดิบได้เป็นอย่างดี การเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิสูง (abused temperature) น่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนฮีสตามีนในวัตถุดิบ

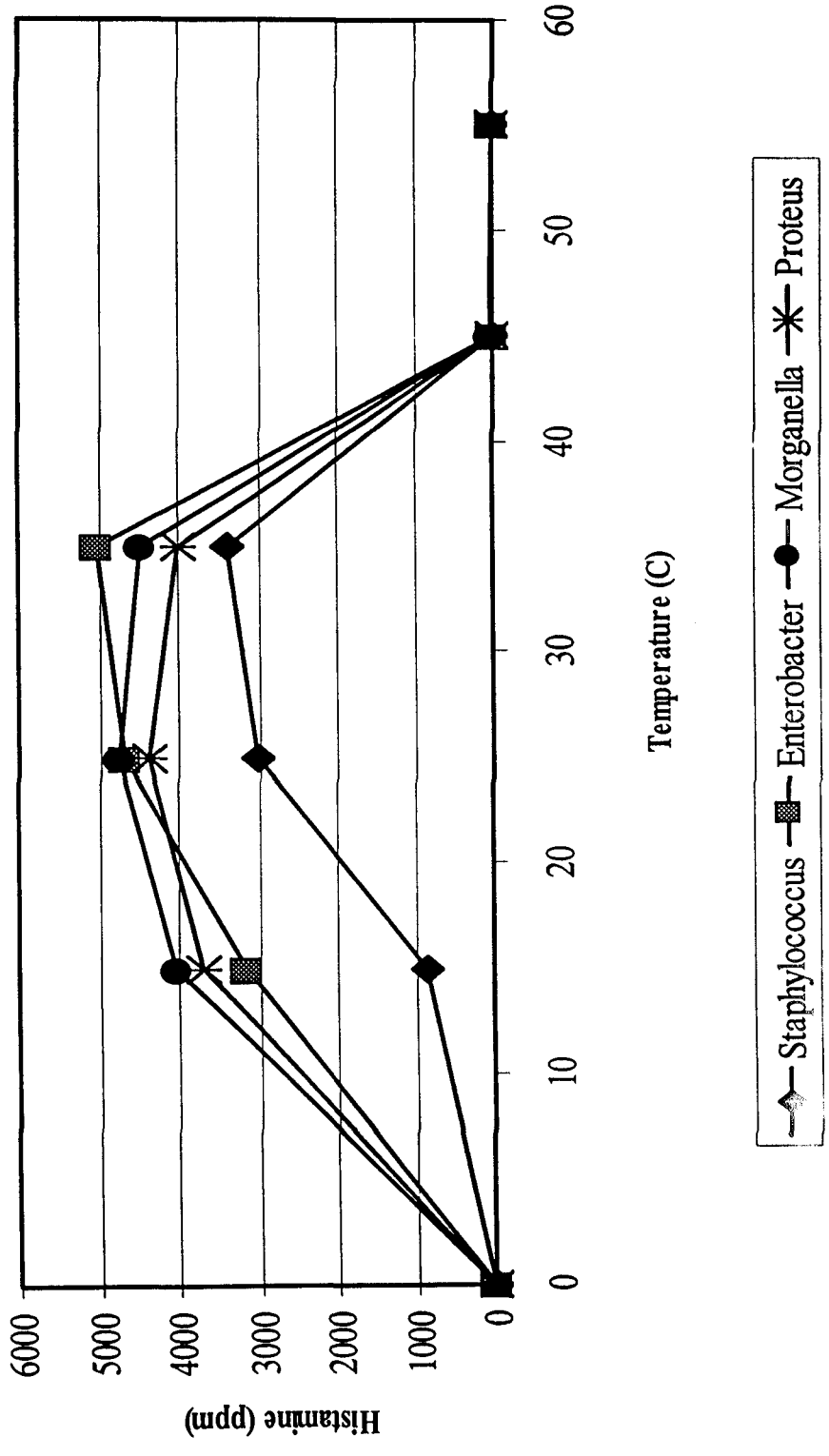
แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เจริญได้ดีในช่วง pH 5-7 โดยมีจำนวนเชื้อในช่วง 9.6-10.3 log CFU/ml หลังจากบ่มที่ 35°ซ 18 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามปริมาณฮีสตามีนมีค่าสูงสุดที่ pH 5 และมีแนวโน้มลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น (รูปที่ 10) ในทุกสายพันธุ์ โดย *Enterobacter aerogenes, Morganella morganii* และ *Proteus vulgaris* สร้างฮีสตามีนได้มากกว่า 4,000 ppm ที่ pH 5 *Morganella morganii* และ *Proteus vulgaris* ที่คัดเลือกจากปลาซาร์ดีนสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดที่ pH 5 เช่นกัน (Ababouch et al.,1991) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสบริสุทธิ์จาก *Enterobacter aerogenes, Morganella morganii* และ *Klebsiella planticola* แสดงกิจกรรมสูงสุดที่

pH 6.5 (Guirard and Snell, 1987) ความแตกต่างของค่า pH ที่เหมาะสมนี้อาจเกิดจากความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ในสภาวะ *in vivo* และเอนไซม์บริสุทธิ์

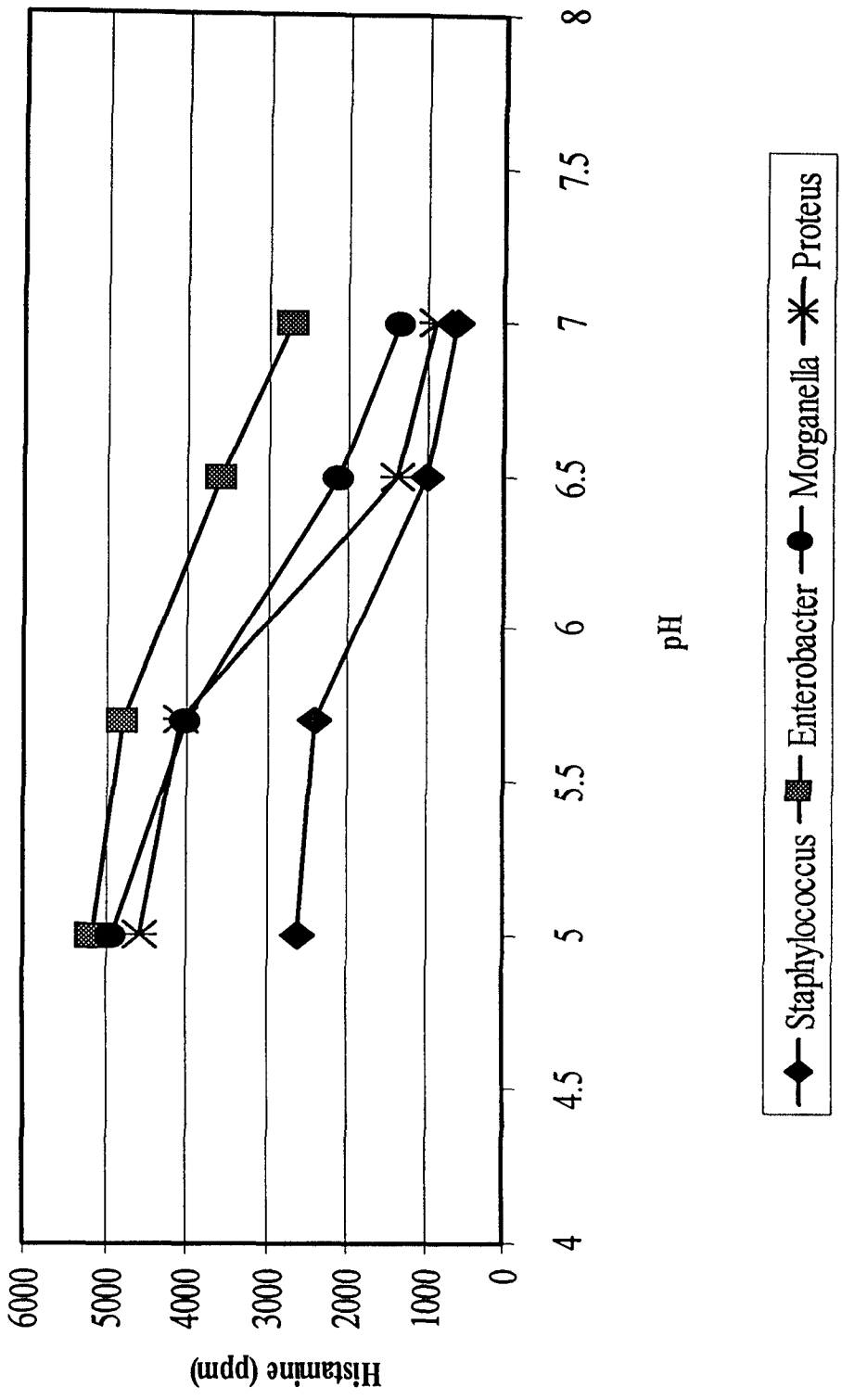
ผลของเกลือต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการสร้างฮีสตามีนแสดงในรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.5% เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเจริญของเชื้อทุกสายพันธุ์ลดลง *Staphylococcus xylosus* เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น 20-25% (รูปที่ 11) เมื่อพิจารณาถึงการสร้างฮีสตามีนพบว่าเชื้อทั้ง หมดสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของNaCl 0.5-5% โดยทั้ง *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* และ *Proteus vulgaris* สามารถสร้างฮีสตามีนได้มากกว่า 2,500 ppm (รูปที่ 12) ในขณะที่ *Staphylococcus xylosus* สร้างฮีสตามีนได้เพียง 34.5 ppm ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5% เมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มเป็น 10% มีเพียงเชื้อ *Enterobacter aerogenes* และ *Morganella morganii* เท่านั้นที่ยังคงสามารถสร้างฮีสตามีนได้ประมาณ 165-181 ppm ภายในระยะเวลา 18ชั่วโมง (รูปที่ 12) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Ababouch et al. (1991) ที่รายงานว่าความสามารถในการผลิตฮีสตามีนของเชื้อ *Morganella morganii* ที่ความเข้มข้น NaCl 8% นั้นสูงใกล้เคียงกับสภาวะที่ไม่มีเกลือ (0%) จากการทดลองนี้ยังตรวจไม่พบการสร้างฮีสตามีนในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์เมื่อความเข้มข้นเพิ่มเป็น 20-25% แม้ว่า*Staphylococcus xylosus* จะยังคงอยู่รอดที่สภาวะความเข้มข้นเกลือสูง (รูปที่ 11) แต่ก็ไม่สามารถสร้างฮีสตามีนที่สภาวะดังกล่าวได้ (รูปที่ 12) ในกระบวนการหมักน้ำปลานั้นเป็นสภาวะที่ความเข้มข้นเกลือสูงประมาณ 25-30% ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นี้จึงอาจไม่มีบทบาทต่อการเพิ่มฮีสตามีนในกระบวนการหมักน้ำปลา นอกจากนี้ ผลการศึกษานี้บ่งบอกว่าการใช้เกลือในช่วง 5-10% ร่วมกับการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิต่ำอาจเป็นแนวทางในการควบคุมปริมาณฮีสตามีนในปลากะตักไม่ให้เกินค่าที่กำหนด

3. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาในห้องปฏิบัติการ

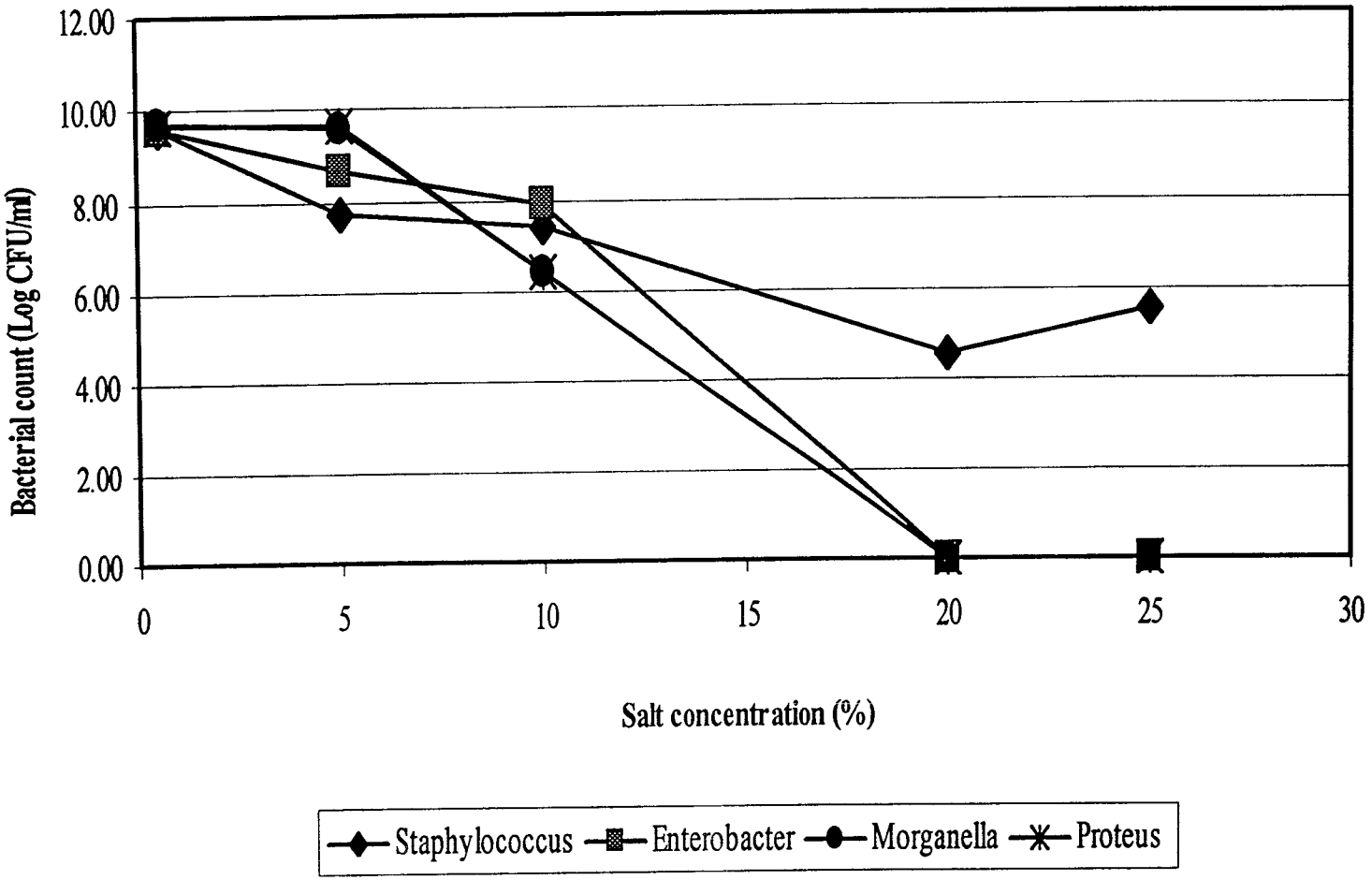
คุณภาพของวัตถุดิบทั้ง 2 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 3 ปลาทั้ง 2 การทดลองเป็นวัตถุดิบที่มีความสด และ อัตราการเน่าเสียแตกต่างกัน ปลาจากชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แต่จัดว่าเป็นปลาที่มีคุณภาพสดปานกลางเนื่องจากปริมาณ total volatile base (TVB) เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ปลาในชุดการทดลองที่ 1 มีฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 29.2 mg/100g ส่วนชุดการทดลองที่ 2 นั้นอาจมีการปนเปื้อนของแบทีเรียที่สร้างฮีสตามีนมากกว่าจึงมีปริมาณฮีสตามีนสูงถึง 169.8 mg/100g ภายใน 16 ชั่วโมง ค่า pH ของปลาเมื่อเกิดการเน่าเสียเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากสารประกอบ volatile base nitrogen



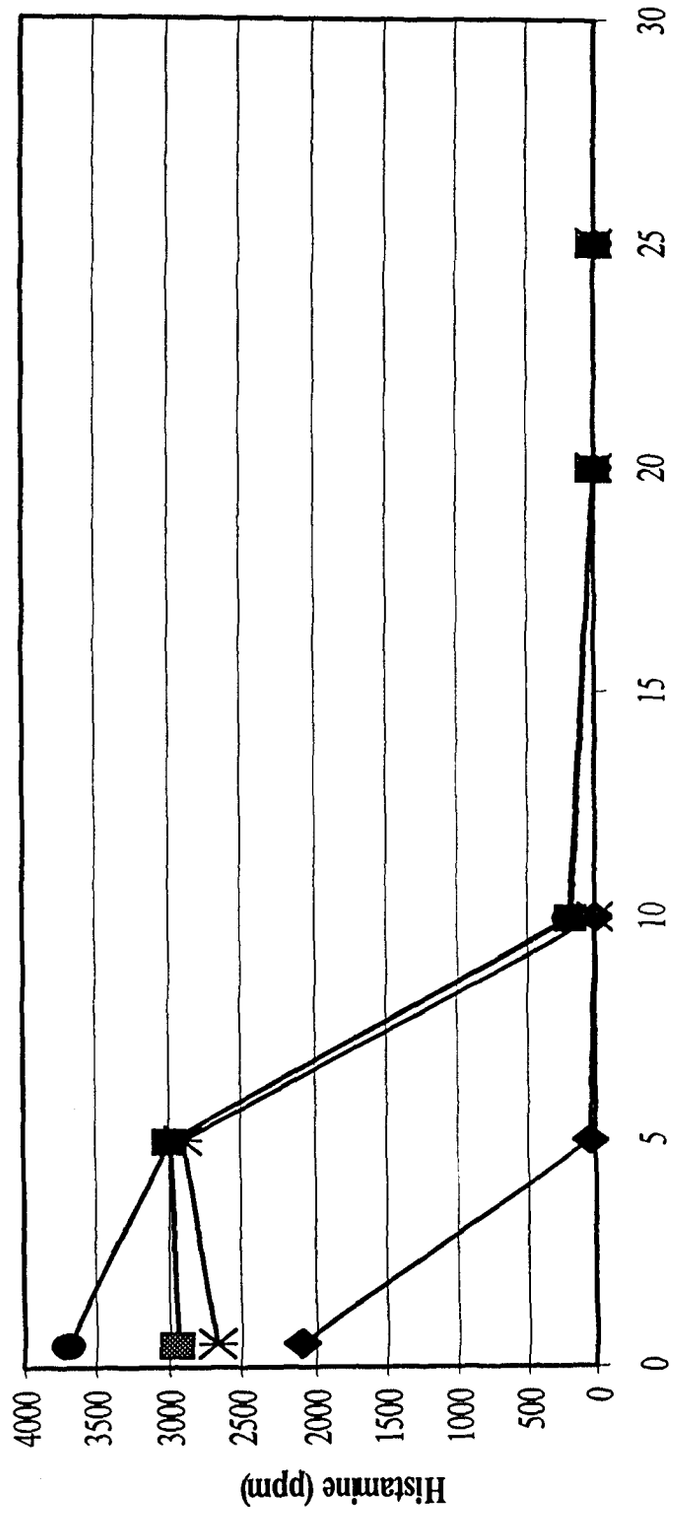
รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้



รูปที่ 10 ผลของ pH ต่อการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากปลากะตัก



รูปที่ 11 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน

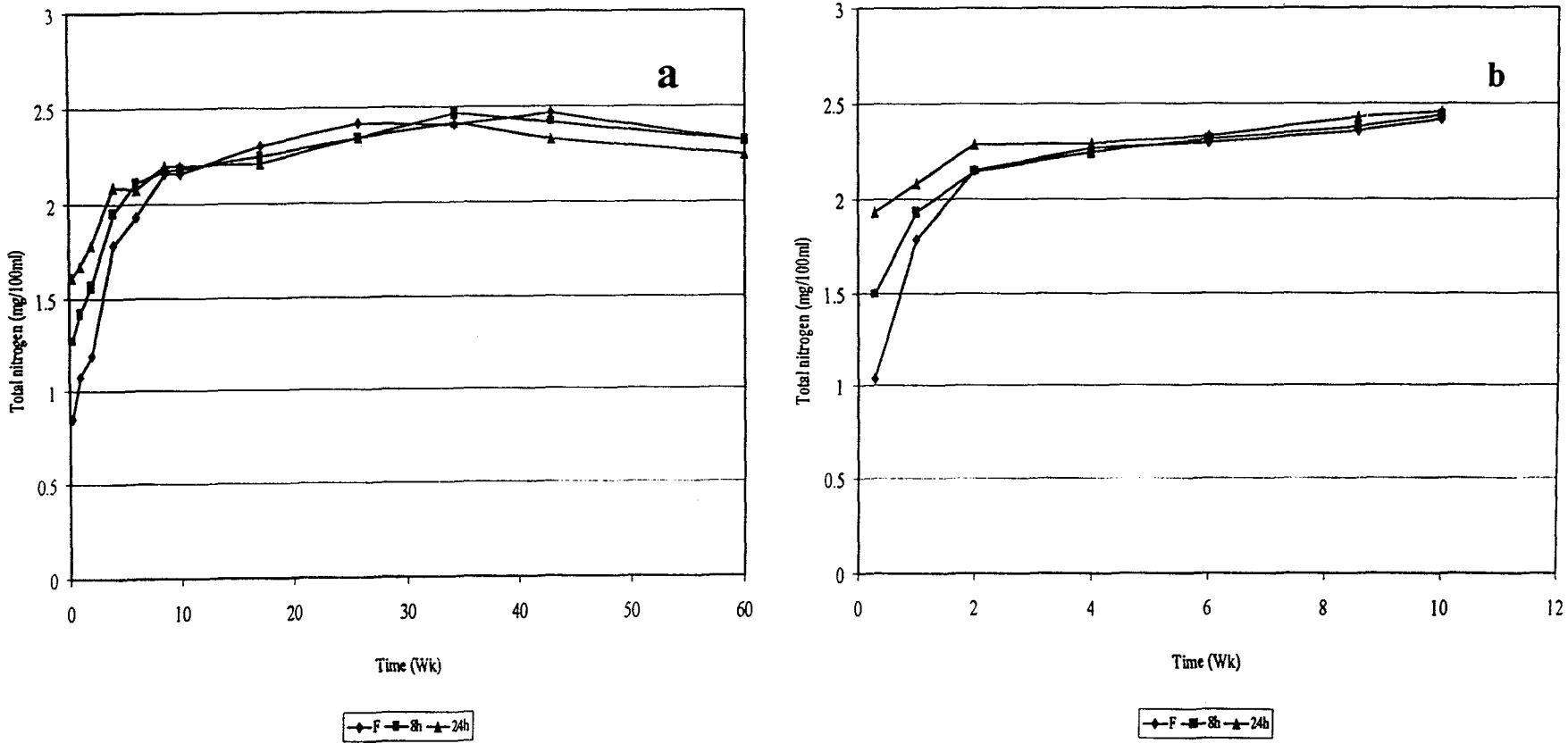


รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการสร้างฮีสตามีนของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

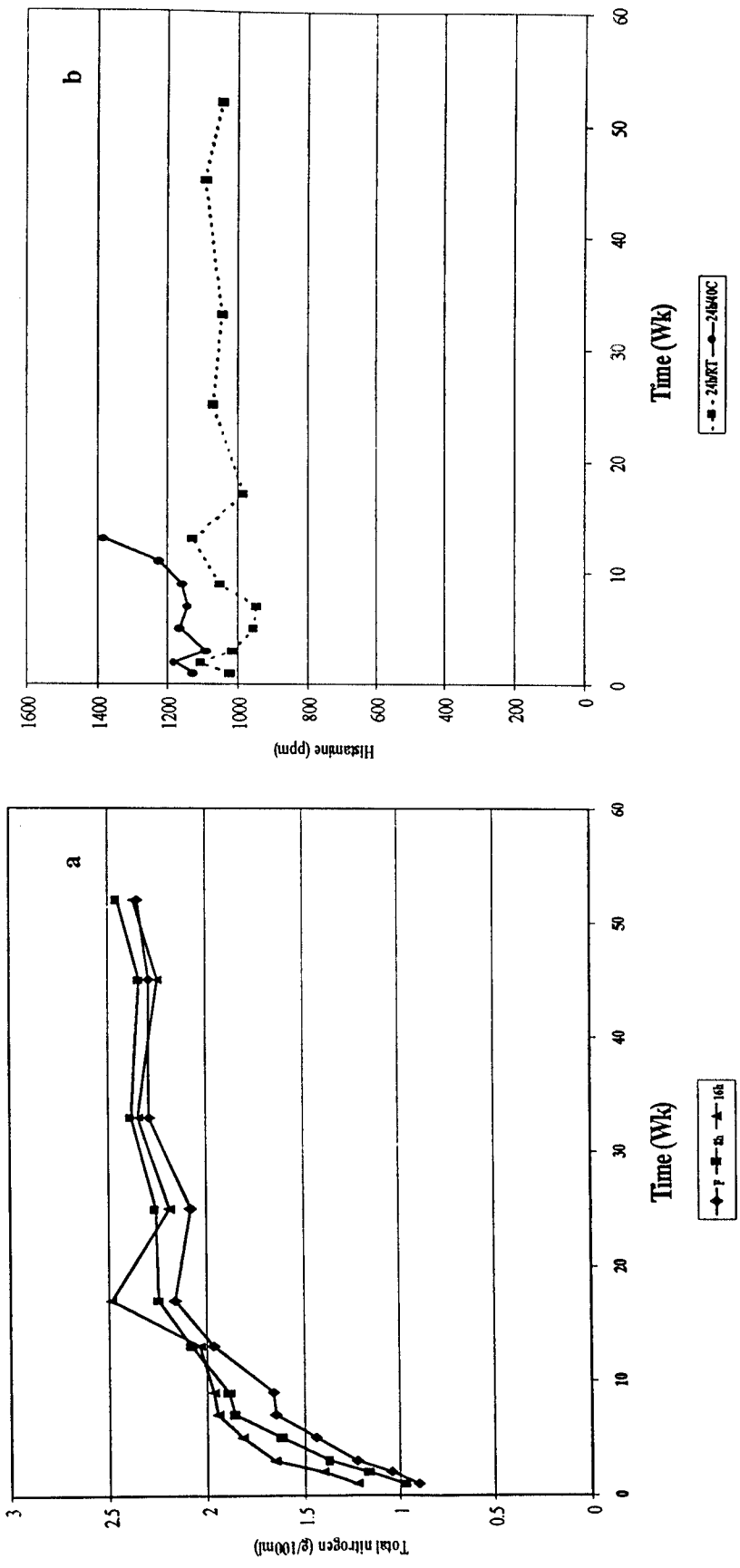
ตารางที่ 3 คุณภาพทางเคมีของปลาที่สภาวะความสดต่างๆ

Rep	Incubation time at 35°C (h)	Histamine (mg/100 g)	pH	Tatal volatile base-nitrogen (mg N/100 g)
1	0	3.36	6.6	27.5
	8	6.53	6.7	41.95
	24	29.25	7.0	218.59
2	0	0.57	6.6	30.5
	8	0.86	6.7	46.4
	16	169.75	6.9	90.08

เมื่อนำตัวอย่างปลาการทดลองที่ 1 และ 2 มาหมักน้ำปลา พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ แสดงดังรูปที่ 13a-b และ 14a-b ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของปลาทั้ง 2 การทดลอง มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน การใช้ปลาเน่า (24h,16h) ในการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ได้ไนโตรเจนรวมของน้ำปลาในระยะ 10 สัปดาห์แรกสูงกว่าการใช้ปลาสดปานกลาง (8h) และปลาสด (F) ($p<0.05$) แต่หลังจาก 10 สัปดาห์ ปริมาณไนโตรเจนรวมของน้ำปลาที่เตรียมจากปลาที่ 3 ระดับความสดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) การตั้งปลาทิ้งไว้ที่ 35°ซ เป็นเวลา 8-24 ชั่วโมงทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของกล้ามเนื้อปลาทั้งจากเอนไซม์ในกล้ามเนื้อลำไส้และจากเชื้อจุลินทรีย์ การย่อยสลายดังกล่าวทำให้ได้กรดอะมิโน และเปปไทด์สายสั้น ละลายออกมาพร้อมกับน้ำจากตัวปลา จึงทำให้ได้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดในระยะแรกสูงกว่าตัวอย่างที่หมักจากปลาสด สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (สมอ.)ได้กำหนดให้น้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 1 ต้องมีไนโตรเจนรวมทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 2 mg/100 ml ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าการหมักปลาที่อุณหภูมิห้องสามารถได้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดเกิน 2 mg/100 ml ในสัปดาห์ที่ 10 สำหรับปลาจากชุดการทดลองที่ 1 (รูปที่ 13a) และในสัปดาห์ที่ 13 สำหรับปลาจากชุดการทดลองที่ 2 (รูปที่ 14a) อย่างไรก็ตาม น้ำปลาในช่วงระยะเวลาดังกล่าวยังคงมีกลิ่นคาวปลาและขาดกลิ่นรสของน้ำปลา ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายโปรตีนจากตัวปลาเกิดขึ้นในระยะ 10-13 สัปดาห์แรกของการหมัก ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังจากสัปดาห์ที่ 13 จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 52 ของการหมัก น้ำปลาที่หมักครบ 1 ปีมีปริมาณไนโตรเจนรวมไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ไม่ว่าวัตถุดิบเริ่มต้นจะมีคุณภาพความสดแตกต่างกันอย่างไรก็ตาม ดังนั้นการใช้ปลาที่มีคุณภาพความสดต่ำไม่ได้ช่วยร่นระยะการหมักน้ำปลาแต่อย่างใด



รูปที่ 13a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)

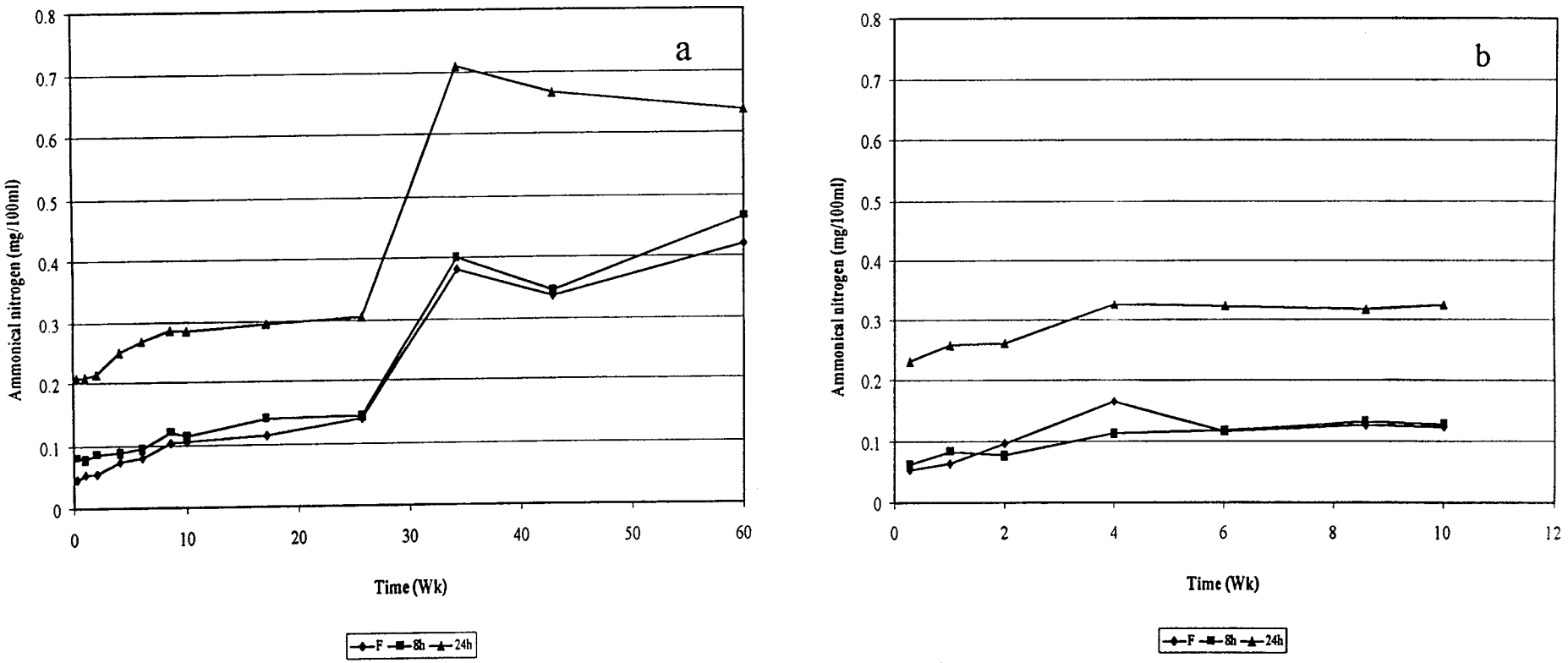


รูปที่ 14a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)

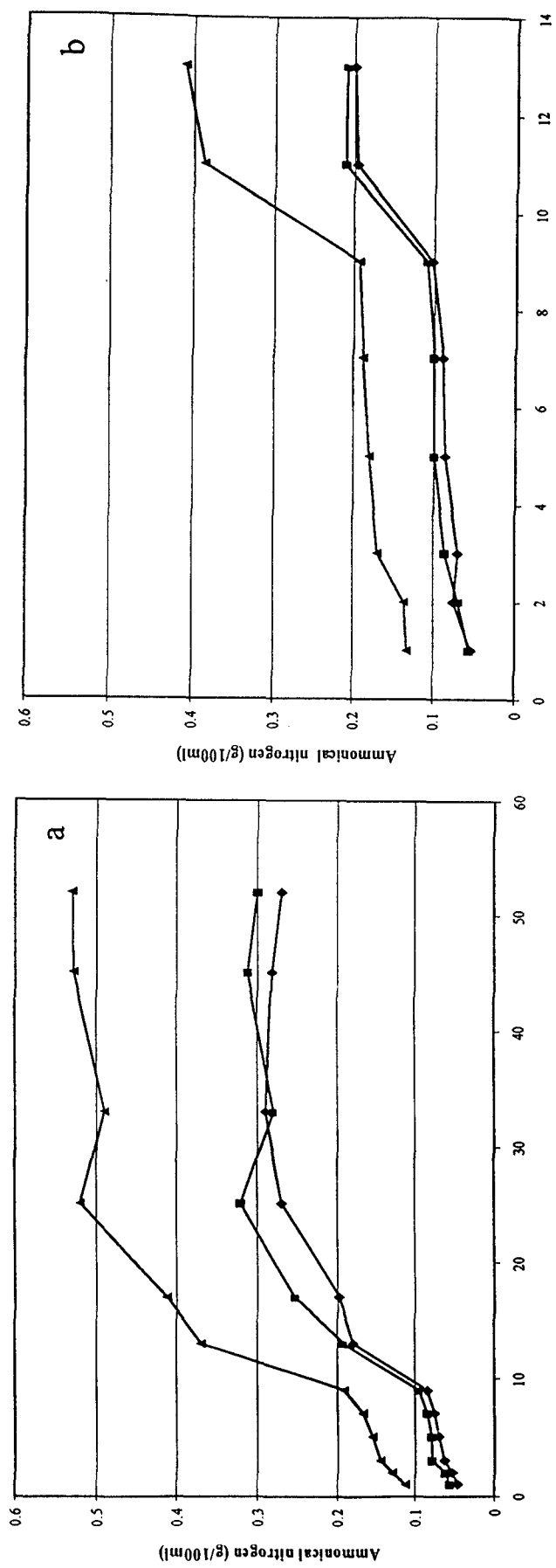
แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของปลาหมักที่ 40°ซ มีลักษณะคล้ายคลึงกับการหมักที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 13b และ 14b) ในระยะเริ่มต้นของการหมัก (2-4 สัปดาห์แรก) น้ำปลาที่เตรียมจากปลาเน่า (24h และ 16h) มีปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างน้ำปลาที่เตรียมจากปลาสด และสดปานกลาง (F และ 8h) แต่หลังจากนั้นปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกัน และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาหมัก 12 สัปดาห์ น้ำปลาหมักที่ 40°ซ มีปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน ($p<0.05$) การเพิ่มอุณหภูมิการหมักสามารถได้ผลิตผลน้ำปลาภายใน 8-12 สัปดาห์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้องของปลา 2 ชุดการทดลองมีลักษณะคล้ายกัน (รูปที่ 15a และ 16a) ในระหว่างกระบวนการหมัก ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดการสร้างแอมโมเนียและสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ เช่น เอมีนโดยจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก เป็นที่น่าสังเกตว่าในตัวอย่างปลาเน่า (24h และ 16h) จะมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงตลอดระยะเวลาการหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากวัตถุดิบเริ่มต้นมีปริมาณแอมโมเนีย และสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้สูงกว่าปลาสด (F) และปลาสดปานกลาง (8h) ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของน้ำปลาหมักที่ 40°ซ มีค่าต่ำกว่าตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 15b และ 16b) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการระเหยของแอมโมเนียที่ 40°ซ คุณภาพความสดของวัตถุดิบมีผลต่อค่าแอมโมเนียไนโตรเจน โดยตัวอย่างปลาเน่ามีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงตลอดระยะเวลาการหมัก 10-12 สัปดาห์ (รูปที่ 15b และ 16b)

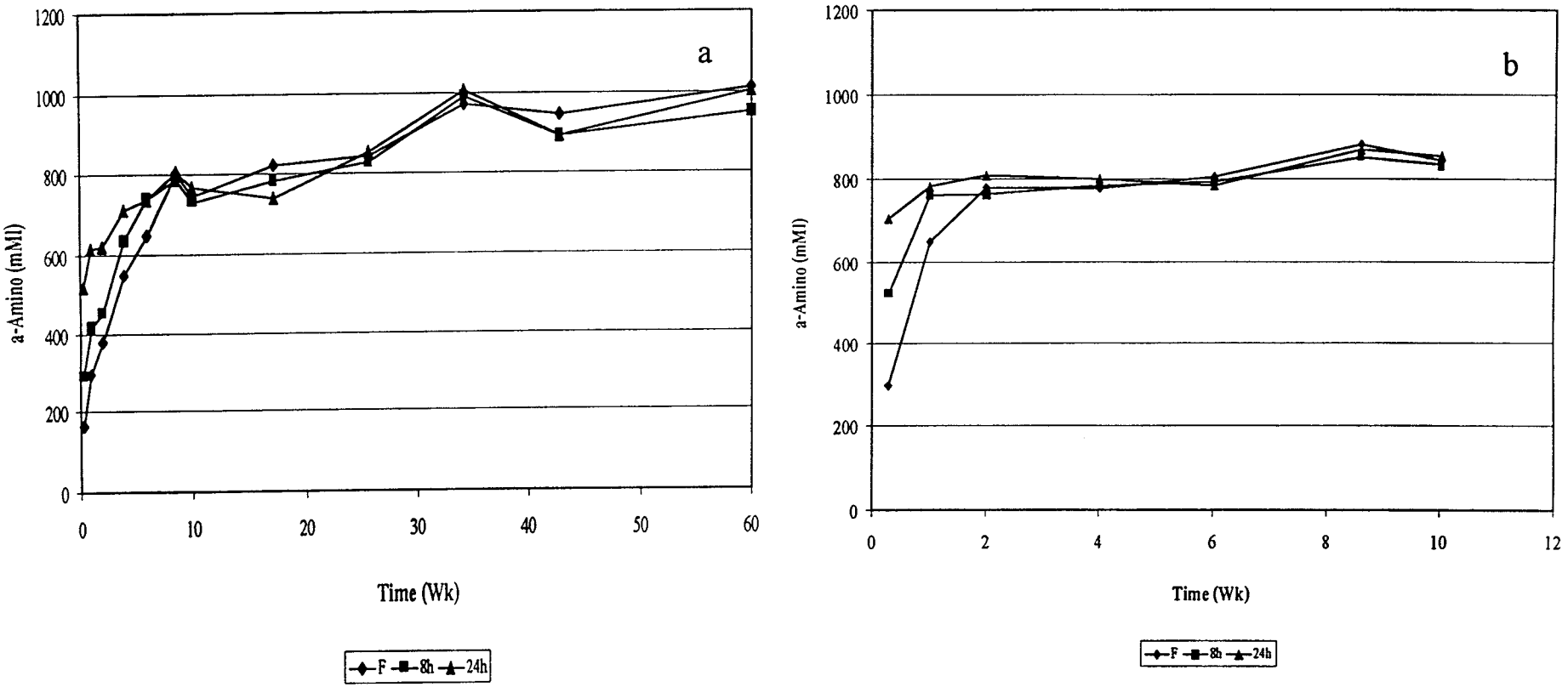
ในการวิจัยนี้ตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนและเปปไทด์ที่ละลายได้ (soluble amino acids and peptides)ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาโดยวัดปริมาณ α-amino ในรูปของกรดอะมิโนลูซีน (leucine) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีลักษณะเช่นเดียวกับปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด พบว่าในระยะแรกของการหมัก (10 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิห้อง น้ำปลาที่หมักโดยใช้ปลาที่เน่าเสีย (16h และ 24h) จะมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยใช้ปลาสด(รูปที่ 17a และ 18a) ทั้งนี้เนื่องจากปลาที่เน่าเสียเกิดการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อเป็นกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์สายสั้นที่ละลายได้ แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 10 การย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย การหมักที่ 40°ซ ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกัน (รูปที่ 17b และ 18b) โดยมีอัตราการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง การเพิ่มอุณหภูมิอาจมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรติเนส จึงเป็นสาเหตุให้เกิดอัตราการย่อยสลายที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามน้ำปลาที่ได้จากการหมักที่ 40°ซ เป็นเวลา 10-12 สัปดาห์ มีปริมาณกรดอะมิโนต่ำกว่าน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี ($p<0.05$)



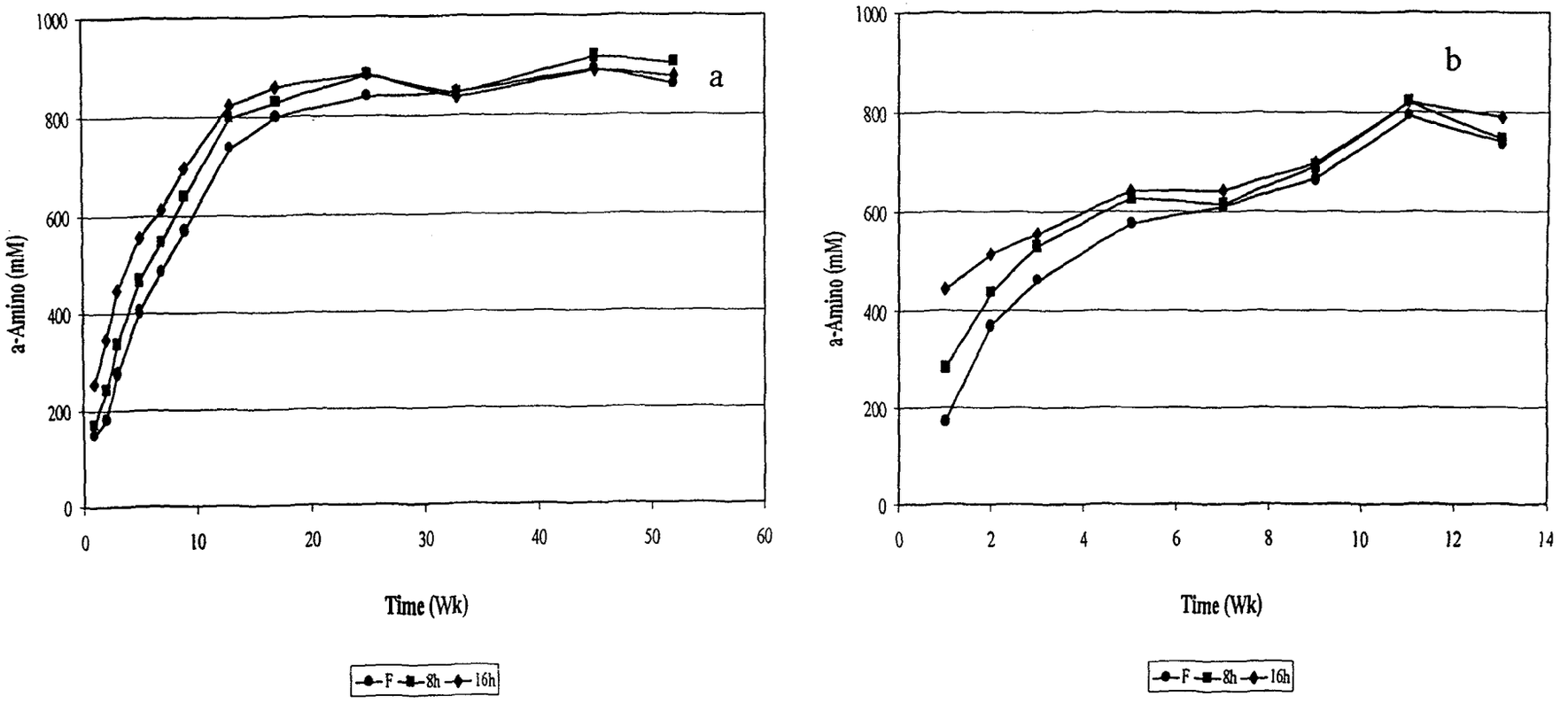
รูปที่ 15a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



รูปที่ 16a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียในโตรเจนระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



รูปที่ 17a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟาอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



รูปที่ 18a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟาอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 **ที่อุณหภูมิห้อง** (a) **และที่** 40°ซ(b)

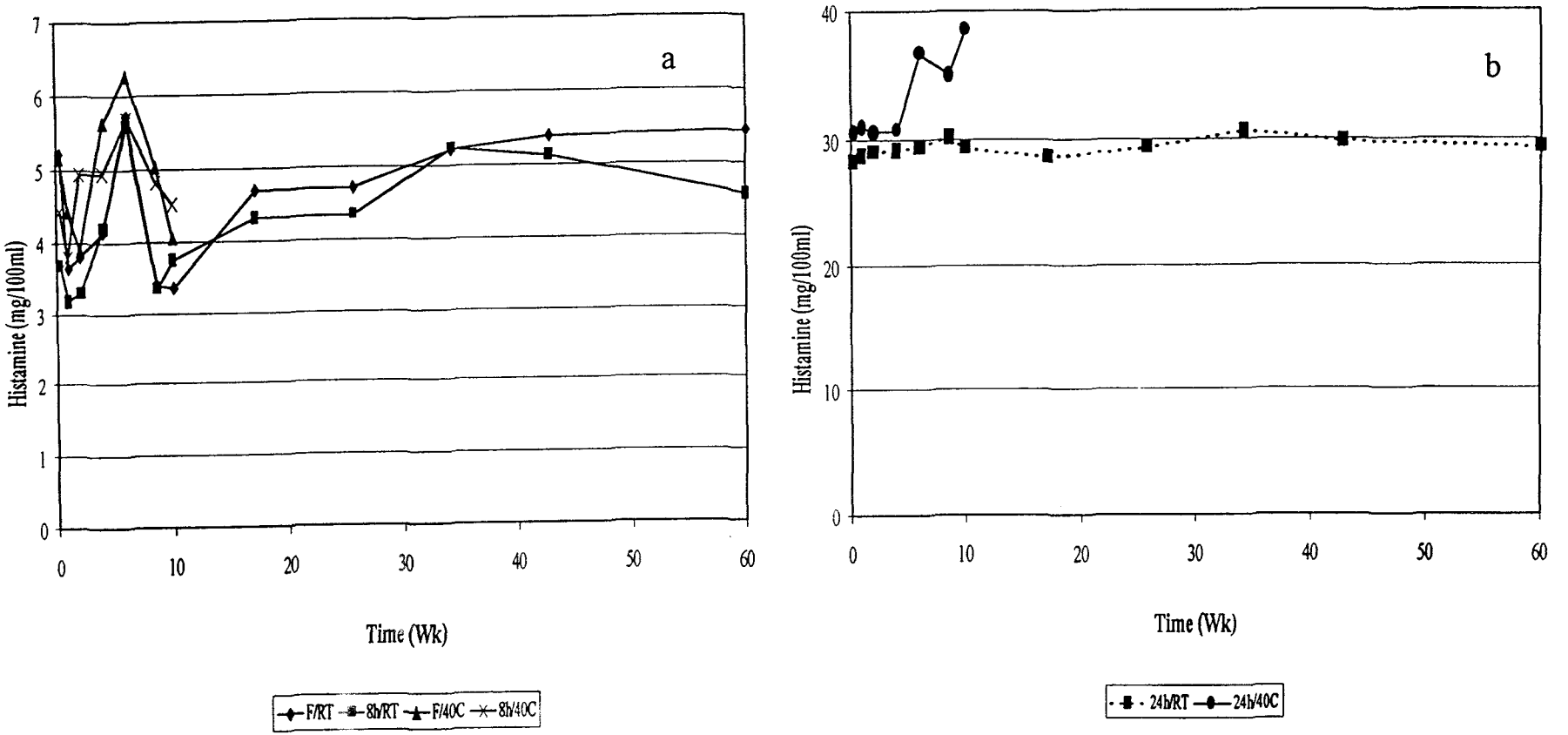
ปริมาณฮีสตามีนในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีการเปลี่ยนแปลงดังรูปที่ 19a-b และ 20a-b ตามลำดับ เนื่องจากปลาสด (F) ในชุดการทดลองที่ 1 มีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่าปลาสดในชุดการทดลองที่ 2 น้ำปลาที่ผลิตจากปลาสดใน การทดลองที่ 1 จึงมีค่าฮีสตามีนสูงกว่าที่อุณหภูมิการหมักเดียวกัน น้ำปลาหมักที่ 40°ซ มีค่าฮีสตามีนสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อวัตถุดิบมีปริมาณฮีสตามีนสูงจะทำให้ได้น้ำปลาที่มีฮีสตามีนสูงด้วย ฮีสตามีนเปลี่ยนแปลงน้อยมากในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ) ($p>0.05$) ไม่ว่าวัตถุดิบตั้งต้นจะมีคุณภาพความสดมากหรือน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคุณภาพของวัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลา อย่างไรก็ตามฮีสตามีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการหมักที่ 40°ซ ทั้งในปลาสด (F) ปลาสดปานกลาง (8h) และปลาเน่า (24h และ 16h) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก 2 สาเหตุคือ ที่ 40°ซ นั้นมีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้มากกว่าที่อุณหภูมิห้อง หรืออาจเกิดจากเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสจากวัตถุดิบเริ่มต้น ซึ่งเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 40°ซ Brillantes et al. (2002) พบว่าฮีสตามีนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อหมักน้ำปลาจากปลาสด แต่หากใช้วัตถุดิบที่มี ฮีสตามีนสูงแล้ว ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

ค่า pH ของวัตถุดิบอยู่ในช่วง 6.6-7.0 (ตารางที่ 3) เมื่อเติมเกลือสมุทร และหมักเป็นเวลา 1 วันที่อุณหภูมิห้อง ค่า pH ลดลงเป็น 5.6-5.9 จากนั้น pH มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 5.8-6.1 จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนได้ 5.4-5.7 หลังจากหมักเป็นเวลา 1 ปี (รูปที่ 21a และ 22a) การลดลงของค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมักเกิดจากกรดระเหยเช่น Acetic, Butyric, Isovaleric acid ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์ (McIver et al., 1982) นอกจากนี้การสร้างกรดแลคติดของ halophilic bacteria ก็มีผลทำให้ pH ลดลง ปลาที่เน่าเสีย (24h และ 16h) จะให้น้ำปลาที่มีค่า pH สูงกว่าปลาสด ทั้งนี้เนื่องจากปลาที่ไม่สดมีปริมาณ volatile base nitrogen สารประกอบประเภทเอมีน ซึ่งมีค่า pH ที่เป็นด่างอยู่ในปริมาณที่สูงกว่า การเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างหมักที่ 40°ซ มีลักษณะเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 21b และ 22b) นอกจากนี้พบว่าน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้องมีค่า pH ไม่ต่างกับน้ำปลาหมักที่ 40°ซ ($p>0.05$)

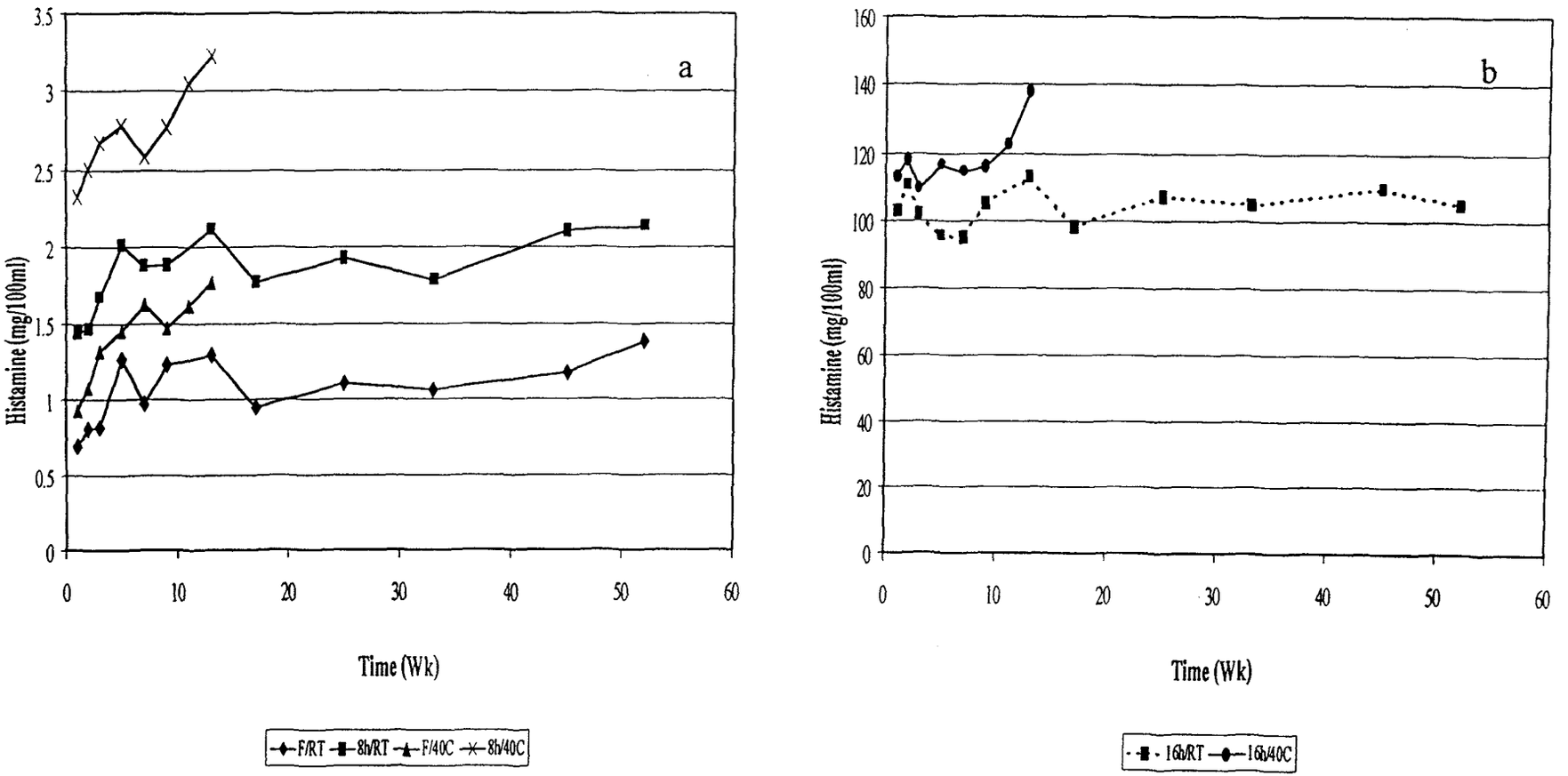
การเปลี่ยนแปลงของสีซึ่งติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm แสดงดังรูปที่ 23a-b และ 24a-b ในช่วงระยะ 2 สัปดาห์แรกของการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง น้ำปลาที่กรองได้ยังคงมีความขุ่นเนื่องจากการแขวนลอยของโปรตีนที่ยังไม่ได้ถูกย่อยสลาย จึงไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ หลังจากหมักเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เริ่มได้สารละลายใส ซึ่งพบว่าน้ำปลาที่หมักจากปลาไม่สด (24h และ 16h) มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าตัวอย่างปลาสด (F และ 8h) ตลอดระยะเวลาการหมัก 1 ปี ($p < 0.05$) สีน้ำตาลของน้ำปลาเกิดจากปฏิกิริยา Maillard browning ระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์ สำหรับปลาที่ไม่สดอาจมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ทำปฏิกิริยากับ

น้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าในตัวอย่างอื่น เนื่องจากกรดอะมิโนถูกเปลี่ยนไปเป็นเอมีนตัวอื่นๆ ด้วยปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันโดยเชื้อจุลินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนฮีสติดีนจะถูกเปลี่ยนเป็น ฮีสตามีน กรดอะมิโนไทโรซีนเปลี่ยนเป็น ไทรามีน กรดอะมิโนทริปโตเฟนเปลี่ยนเป็นทริปทามีน กรดอะมิโนไลซีนเปลี่ยนเป็นคาดาเวอรีน

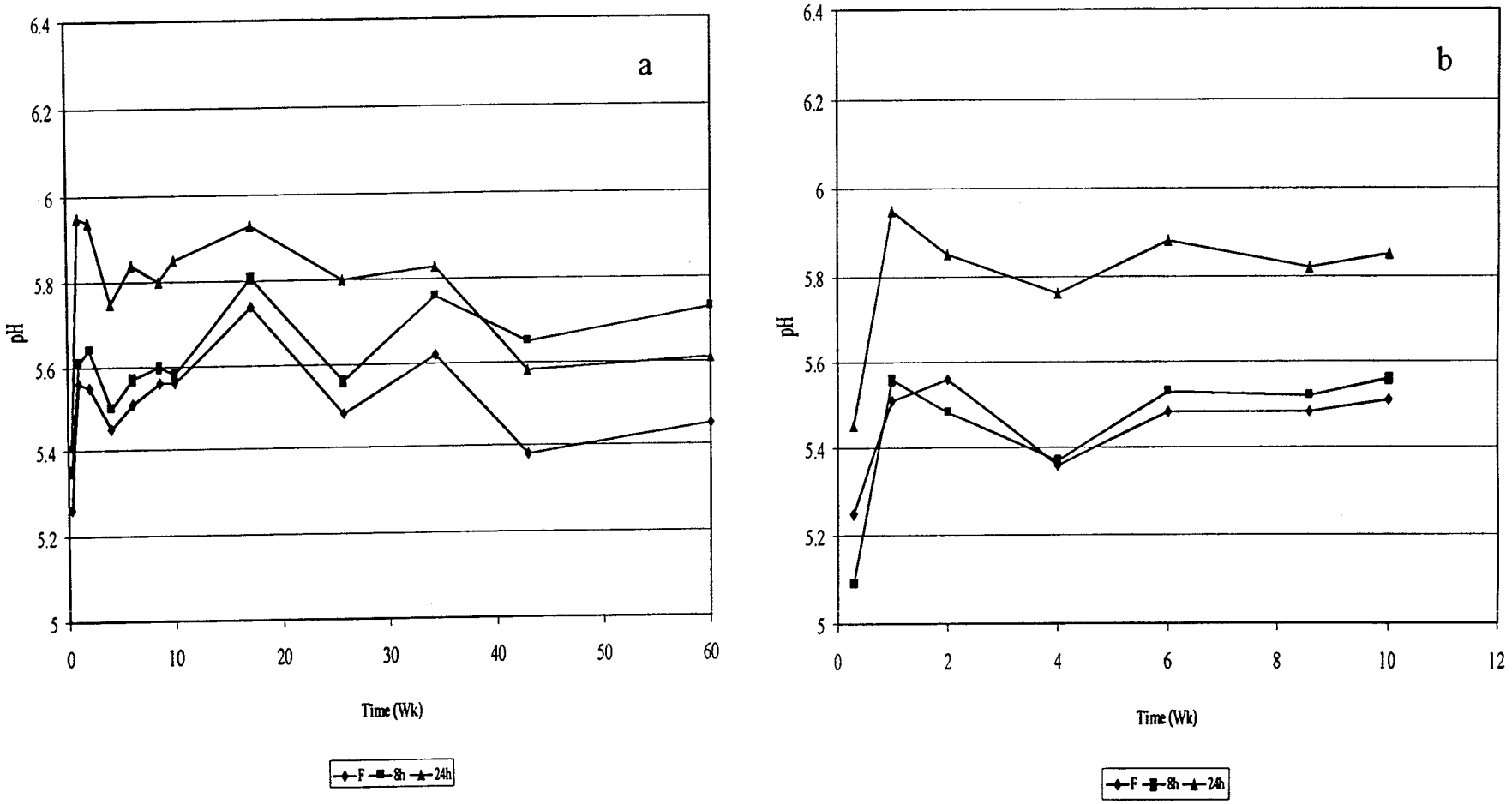
นอกจากนี้กรดอะมิโนอาร์จินีนเปลี่ยนเป็นออร์นิธีนและพิวทรีซีน การเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของค่าการดูดกลืนแสงแสดงให้เห็นว่าเกิดสีน้ำตาลอมแดงเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก เนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีนทำให้ได้กรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิด Maillard browning ส่วนการหมักที่ 40°ซ จะทำให้ได้น้ำปลาใสในช่วงสัปดาห์แรก อัตราการย่อยสลายที่สูงกว่าในช่วงวันแรกของการหมักที่ 40°ซ ทำให้ได้ปริมาณของเหลวจากตัวปลาที่มากกว่า จึงไม่เกิดสารแขวนลอยขุ่น นอกจากนี้ปลาที่ไม่สดยังคงให้น้ำปลาสีน้ำตาลอมแดงน้อยกว่าปลาสด (รูปที่ 23b และ 24b) น้ำปลาที่หมัก 10-12 สัปดาห์ที่ 40°ซ มีสีน้ำตาลอมแดงน้อยกว่าน้ำปลาที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี ($p< 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำปลาหมักที่ 40°ซ มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยกว่าน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 17a-b และ 18a-b) จึงเกิด ปฏิกิริยา Mailland browning น้อยกว่า



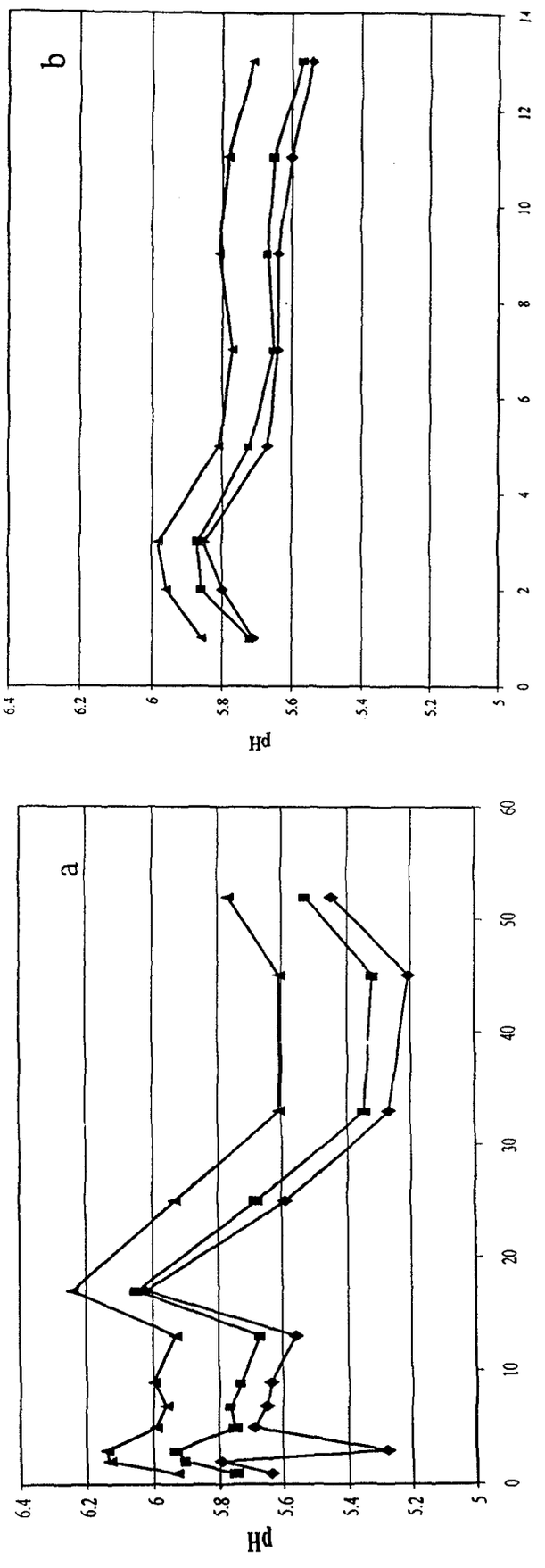
รูปที่ 19a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



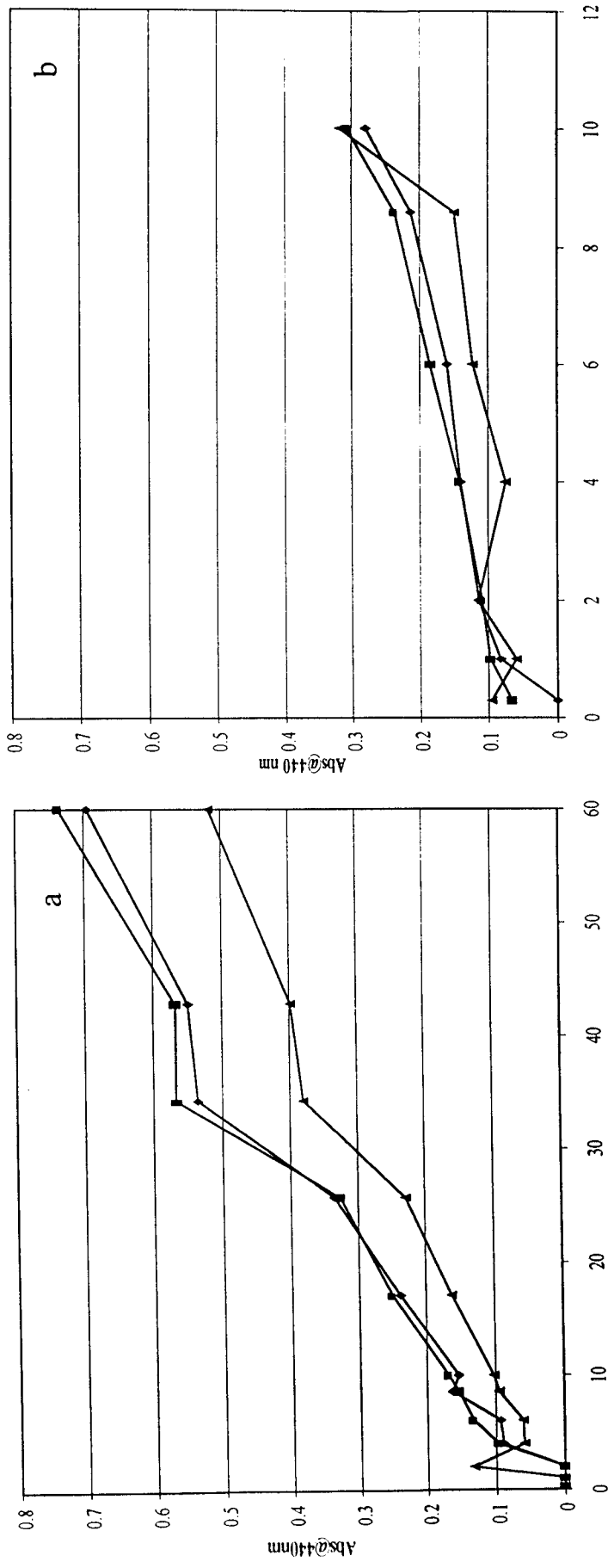
รูปที่ 20a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



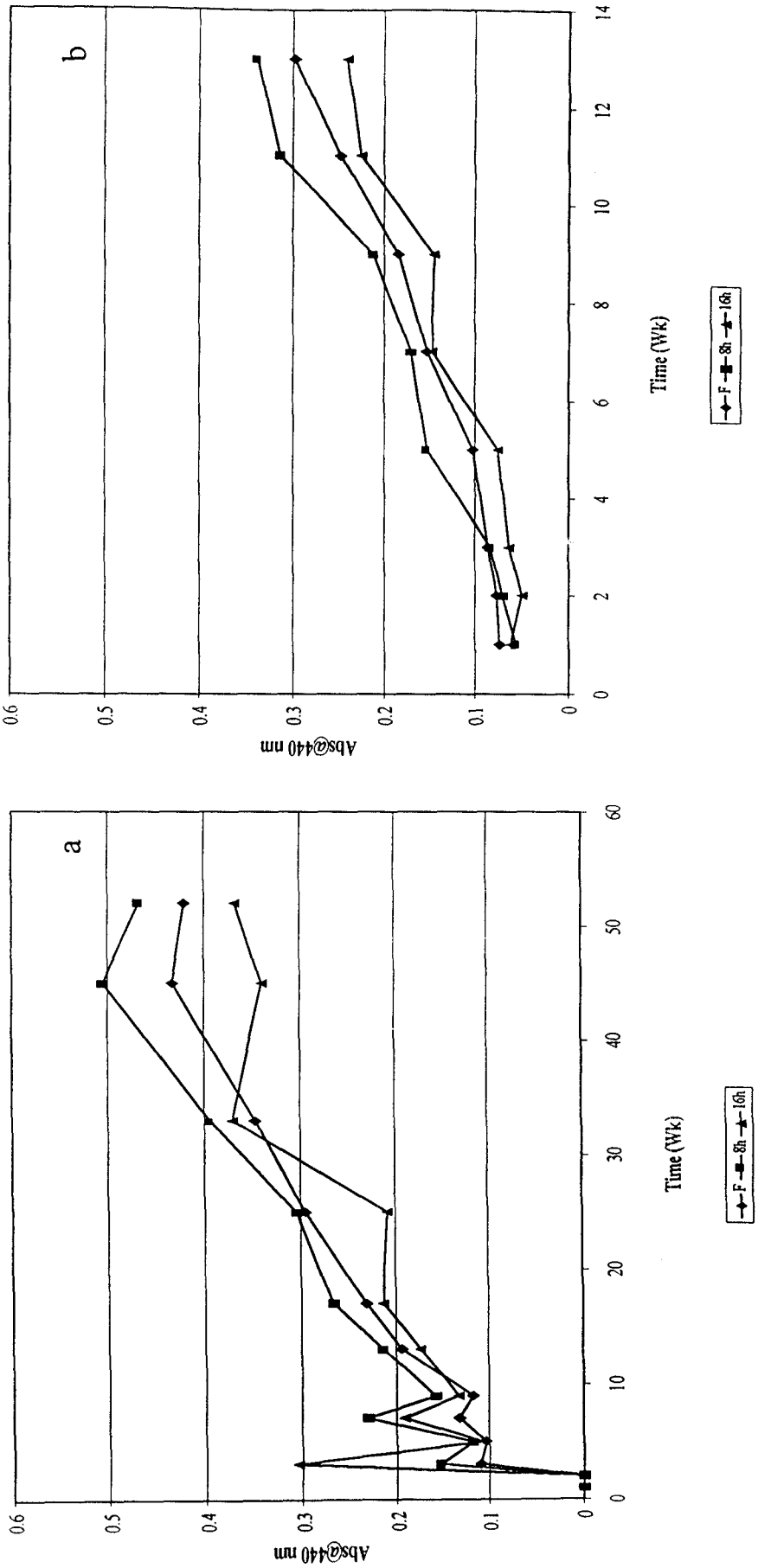
รูปที่ 21a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



รูปที่ 22a-b การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



รูปที่ 23a-bการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)

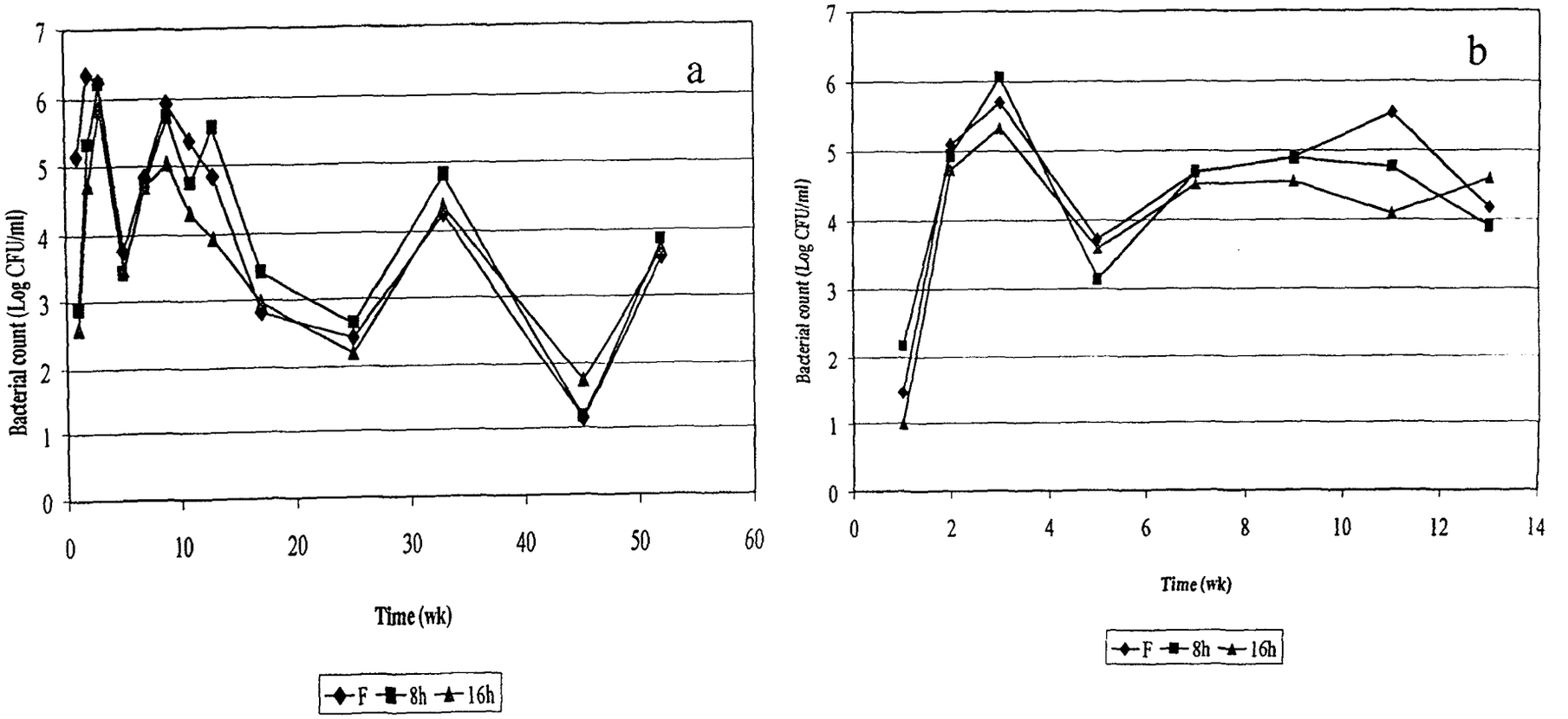


รูปที่ 24a-bการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)

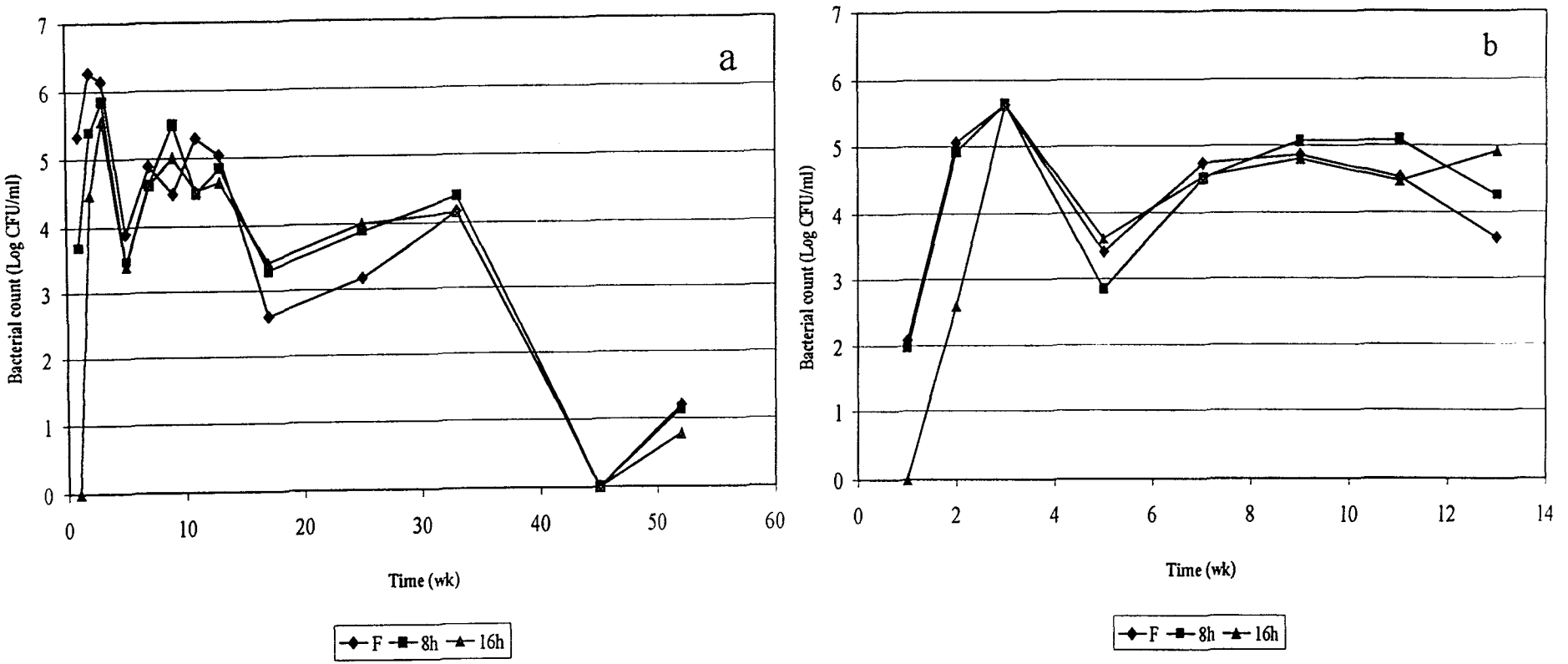
4. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักของปลาจากชุดการทดลองที่ 2 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดของตัวอย่างปลาสด (F) ปลาสดปานกลาง (8h) และปลาเน่า (16h) หมักที่อุณหภูมิห้องเพิ่มขึ้นสูงในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 (รูปที่ 25a) คือมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^5-10^6 CFU/มิลลิลิตร ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่างปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบ และการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์รวมของปลาที่มีคุณภาพความสดต่างกันมีรูปแบบที่คล้ายกัน สำหรับตัวอย่างปลาเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 40°ซ. นั้น พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ในสัปดาห์แรกของการหมักน้อยกว่าตัวอย่างจากการหมักที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-3 log cycles (รูปที่ 25b) สภาวะหมักที่อุณหภูมิสูงอาจยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ปนเปื้อนกับวัตถุดิบ (ปลาสดและปลาที่เน่าเสีย) พบการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ของกระบวนการหมักน้ำปลาทั้ง 3 ตัวอย่าง คือพบจำนวน 5.05×10^5, 1.15×10^6 และ 2.18×10^5 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเค็มหรือสามารถทนเค็มได้ดี จากนั้นจำนวนจุลินทรีย์เริ่มลดลง และคงที่ในช่วงสัปดาห์ที่ 7-10 และเป็นที่น่าสังเกตว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างที่มีคุณภาพความสดต่างกันนั้น มีจำนวนจุลินทรีย์ใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (โซเดียมคลอไรด์25%) อาจทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย (spoilage microorganisms) ซึ่งปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมากในปลาที่ไม่สดหรือปลาเน่าไม่สามารถเจริญได้ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในสภาวะนี้จึงน่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเค็มหรือทนเค็มได้ดี

การเปลี่ยนแปลงจำนวน (ปริมาณ) ของจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven มีลักษณะคล้ายคลึงกับจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมด (รูปที่ 25a,b และ 26a,b) แม้ว่าในตัวอย่างที่มีปริมาณฮีสตามีนสูง คือปลาเน่า (16h) ก็พบจำนวนจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับที่พบในตัวอย่าง ปลาสด (F) หรือปลาสดปานกลาง (8h) ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ. (รูปที่ 26a,b) จากที่กล่าวในข้างต้นว่าอาหาร Niven อาจให้ผลบวกที่ผิด (false positive) ได้ ดังนั้นจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจนับได้นี้อาจไม่ได้แสดงถึงจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนอย่างแท้จริงทั้งหมด อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตุว่าจำนวนแบคทีเรียที่คาดว่าจะสร้างฮีสตามีนในตัวอย่างหมักที่ 40°ซ. มีปริมาณสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนตลอดระยะเวลาการหมักที่ 40°ซ. ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาคือ คุณภาพความสดของปลา ปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีนัยสำคัญ และแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ทำให้ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักที่ 40°ซ.



รูปที่ 25a-b การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)



รูปที่ 26a-b การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารไนเวนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)

แบคทีเรียที่ชอบเจริญในที่เค็มซึ่งจัดเป็นกลุ่ม Halophilic bacteria ที่ตรวจพบในการศึกษานี้อาจรวม Halotolerants มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 10 สัปดาห์แรกทั้งที่อุณหภูมิห้องและ 40°ซ. (รูปที่ 27a,b) จากนั้นลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในสัปดาห์ที่ 25-33 สำหรับตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้อง และลดลงจนมีจำนวนน้อยมากเมื่อหมักครบระยะ 1 ปี ส่วนตัวอย่างปลาหมักที่อุณหภูมิ 40°ซ. นั้น จำนวน Halophilic bacteria เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 12 ซึ่งเป็นทำนองเดียวกับตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลาเดียวกัน จึงเห็นได้ว่าอุณหภูมิในการหมักไม่มีผลต่อปริมาณ Halophilic bacteria นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวใกล้เคียงกันแม้ว่าคุณภาพความสดของปลาจะต่างกัน

จุลินทรีย์ชอบเจริญในที่เค็มเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักน้ำปลา โดยสร้างโปรติเนสในการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างกลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะของน้ำปลา จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสมบัติประกอบในการระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาที่ระยะเวลาต่างๆ (ภาคผนวก ง) พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่สามารถสร้างโปรติเนสซึ่งสังเกตจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนคือ เคซีน (Casein) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar เป็นแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้อาหาร Halobacterium medium และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นท่อน (Rod-shaped cell) พบทั้งชนิดที่สร้างสปอร์และไม่พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่พบและสามารถระบุชนิดได้ คือ *Bacillus pathothenticus* ซึ่ง Sneath et al. (1986) ระบุว่าเป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4% เพื่อกระตุ้นการเจริญ และจากการศึกษาครั้งนี้พบ *Bacillus pathothenticus* ในสัปดาห์ที่ 1 ของกระบวนการหมักน้ำปลา จากการใช้วัตถุดิบที่เป็นปลาสด (F) หมักที่อุณหภูมิ 40°ซ. และสัปดาห์ที่ 5 จากวัตถุดิบที่เป็นปลาสด (F) หมักที่อุณหภูมิห้อง และปลาสดป่านกลาง (8h) หมักที่อุณหภูมิ 40°ซ. และในตัวอย่างเกลือสมุทร ดังแสดงในตารางที่ 4 และพบแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่แยกได้โดยใช้ Halobacterium medium ซึ่งมีสมบัติคล้าย *Sporohalobacter* ตาม Holt et al. (1994) จากกระบวนการหมักน้ำปลาในสัปดาห์ที่ 7 เมื่อใช้ปลาสดป่านกลาง (8h) เป็นวัตถุดิบทั้งการหมักที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 40°ซ. และเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่ตรวจพบในตัวอย่างเกลือสมุทรเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนและมีสมบัติแตกต่างจากที่กล่าวมาข้างต้นอีกหลายไอโซเลท (ตารางที่ 4) ซึ่งจะศึกษาเพื่อการระบุชนิดให้แน่นอนต่อไปในอนาคต แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนทุกไอโซเลท ดังกล่าวข้างต้นจัดได้ว่าไม่มีความสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาตามผลการทดสอบดังแสดงในตารางผนวกที่ 1 และจากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 4 เห็นได้ว่าพบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนเป็นจำนวนมากในสัปดาห์ที่ 5 และ 7 ของการหมักน้ำปลา และหากพิจารณาการเพิ่มขึ้นของ α-amino acids ของน้ำปลาในตัวอย่างเดียวกัน (รูปที่ 17a และ b) พบว่าค่าดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น

อย่างต่อเนื่องถึงสัปดาห์ที่ 10 และอัตราการเพิ่มปริมาณ α-amino acids เริ่มคงที่หลังจากนั้น การเพิ่มขึ้นของ α-amino acids อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมของโปรติเนสที่สร้างจาก Halophilic bacteria

จากภาคผนวก ง และตารางที่ 5 พบแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในปริมาณ 3 ppm ขึ้นไปตั้งแต่สัปดาห์แรกของกระบวนการหมักน้ำปลา และพบแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteria ที่สามารถสร้างฮีสตามีนในช่วงสัปดาห์ที่ 2-3 ของการหมัก เป็นส่วนใหญ่ จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนซึ่งพบในสัปดาห์ที่ 1 ของการหมัก คือ *S. epidermidis* และพบในตัวอย่างที่วัตถุดิบมีคุณภาพความสดต่ำ (16h) โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างฮีสตามีนใน HE medium ในปริมาณที่มากกว่า 50 ppm และไม่พบเชื้อดังกล่าวในระยะต่อมา Hernandez-Herrero (1999) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* หลายสายพันธุ์สร้างฮีสตามีนในปลา anchovy ดองเค็ม ซึ่ง *Staphylococcus epidermidis* และ *S. capitis* สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 1,000 และ 400 ppm ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 และ 10% นอกจากนี้ อารีย์ (2542) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ จุลินทรีย์ในบ่อหมักน้ำปลาในระดับอุตสาหกรรม และพบว่าบางสายพันธุ์ของแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcu* และ *Micrococcus* สามารถสร้างฮีสตามีนได้มากกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Staphylococcus* ที่พบในน้ำปลามีบทบาทในการสร้างฮีสตามีน อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในกระบวนการหมักค่อนข้างน้อยโดยเฉพาะในตัวอย่างที่หมักที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการสร้างฮีสตามีนที่ต่ำของ *Staphylococcus epidermidis* ที่แยกได้จากการศึกษานี้ การเพิ่มปริมาณของฮีสตามีนในน้ำปลายังมีผลมาจากการเจริญของ Enterobacteria ซึ่งที่ตรวจพบในกระบวนการหมักน้ำปลาครั้งนี้ จัดอยู่ในสกุล *Enterobacter* และ Species เด่นที่พบคือ *E. cloacae* ตามที่มีรายงานถึงแหล่งของแบคทีเรีย Species นี้ระบุว่าพบเป็นปกติในอุจจาระของสัตว์และไม่จัดว่าเป็น Enteric pathogen (Krieg and Holt, 1984) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนและมีสมบัติแตกต่างจาก Enterobacter อีกหลายไอโซเลท (ตารางที่ 5) ที่สามารถสร้างฮีสตามีนในปริมาณมากกว่า 3 ppm และยังไม่สามารถระบุชนิดได้ถึงแม้ได้ทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี API-20E (BIO-Merieux) ซึ่งจะศึกษาเพื่อการระบุชนิดให้แน่นอนต่อไปในอนาคต และจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่า Halophilic bacteria ที่แยกได้โดยใช้ Halobacterium medium สามารถสร้างฮีสตามีน แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการสร้างฮีสตามีนของจุลินทรีย์ที่ชอบเค็ม Satomi et al. (1997) พบแบคทีเรีย *Tetragenococcus muriaticus*, sp. Nov. ใน Fermented squid liver sauce จารุวรรณ (2542) พบ *Tetragenococcus* บางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในช่วง 0.036-52.3 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งเห็นได้ว่าความสามารถในการสร้างฮีสตามีนมีค่าความแปรปรวน (variation) ที่ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สร้าง Caseinase จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาทั้งสิ้น 124 ไอโซเลท (ภาคผนวก ง) ด้วยอาหาร Skim milk agar

Fermention Time (Week)	Caseinase-producing bacteria[a]					
	Fish sauce fermentation at room temperature			Fish sauce fermentation at 40°C		
	Fresh fish (F)	Fish (8h)	Fish (16h)	Fresh fish (F)	Fish (8h)	Fish (16h)
1	ND[b]	ND[b]	ND[b]	**B3** (*B. pan-thothenticus*)	ND[b]	ND[b]
2	ND[b]	ND[b]	**HE3** (G^+, rod-shaped cell, spore former)	ND[b]	ND[b]	ND[b]
3	ND[b]	ND[b]	**HE4** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	ND[b]	**HD6** (G^+, rod-shaped cell, spore former)	ND[b]
5	**A36** (*B. pantho-thenticus*) **HA14** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	**HC15** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	**E31** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	**B31** (G^+, rod-shaped cell, spore former) **HB5** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	**D34** (*B. pantho-thenticus*)	**F24** (G^+, rod-shaped cell, no spore found) **F25** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)

[a]Caseinase-producing bacteria: *B.* = *Bacillus*

[b]ND = Not detected from all isolates tested

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Fermention Time (Week)	Caseinase-producing bacteria[a]					
	Fish sauce fermentation at room temperature			Fish sauce fermentation at 40°C		
	Fresh fish (F	Fish (8h)	Fish (16h)	Fresh fish (F)	Fish (8h)	Fish (16h)
7	**A44** (G^+, rod-shaped cell, no spore found) **HA19** (G^+, rod-shaped cell, spore former)	**HC16** (~*Sporoha-lobacter* sp.)	ND[b]	**B38** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	**HD13** (~*Sporoha-lobacter* sp.)	ND[b]
9	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
11	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
13	ND[b]	**C59** (G^+, rod-shaped cell, spore former)	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
17	ND[b]	ND[b]	ND[b]			
25	ND[b]	**MC1** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)	**ME2** (G^+, rod-shaped cell, no spore found)			
33	ND[b]	ND[b]	ND[b]			
Salt (Sea salt)	**S3** (*B. panthothenticus*) **HS8** (~*Sporohalobacter* sp.)					

[a]Caseinase-producing bacteria: *B.* = *Bacillus*

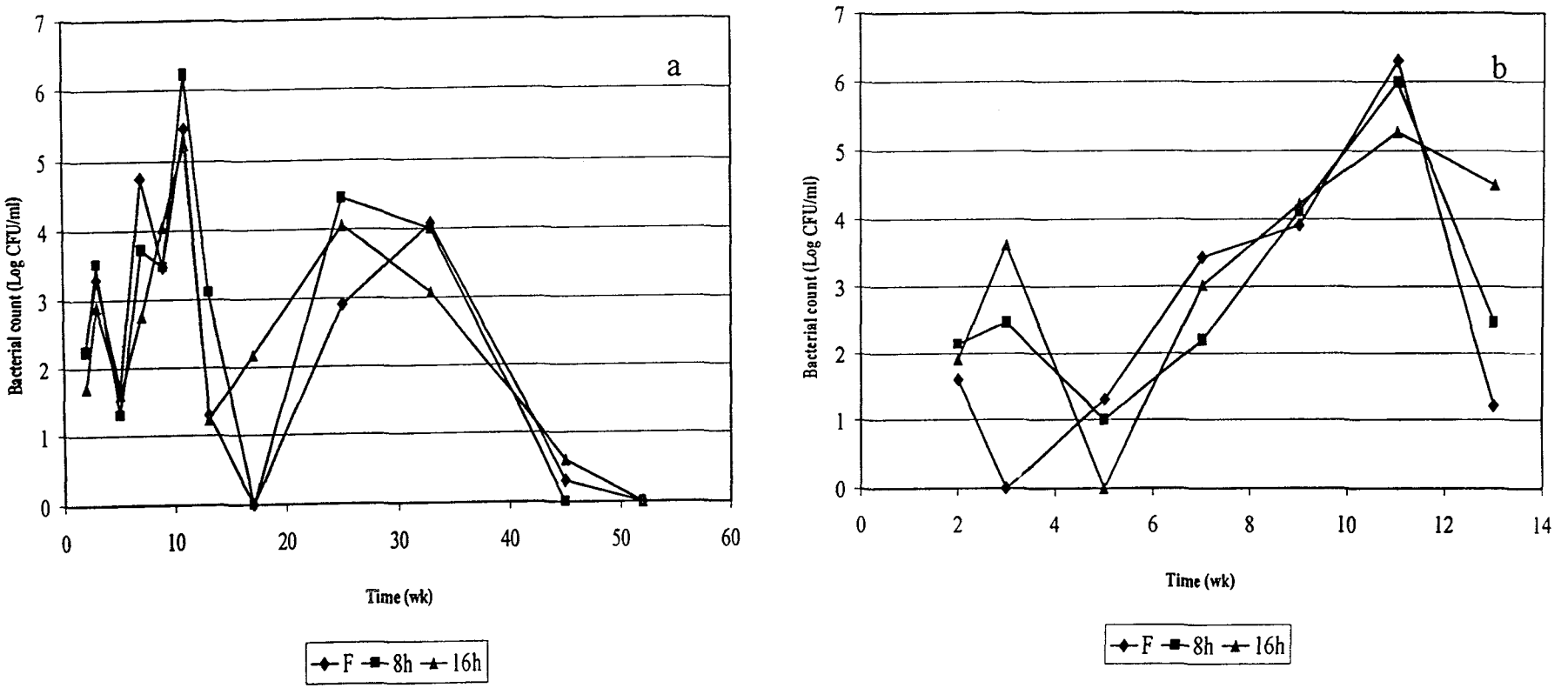
[b]ND = Not detected from all isolates tested

ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณตั้งแต่ 3 ppm ขึ้นไป จากการทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างจากกระบวนการหมักน้ำปลาทั้งสิ้น 124 ไอโซเลท (ภาคผนวก ง) โดยใช้อาหาร Histamine evaluation broth (HEB)

Fermention Time (Week)	Histamine-forming bacteria[a]					
	Fish sauce fermentation at room temperature			Fish sauce fermentation at 40°C		
	Fresh fish (F	Fish (8h)	Fish (16h)	Fresh fish (F)	Fish (8h)	Fish (16h)
1	ND[b]	ND[b]	**E1** (*S. epi-dermidis*)	ND[b]	ND[b]	ND[b]
2	**A7** (G^-, rod-shaped cell)	**C11** (*E. cloacae*)	**E7** (*E. cloacae*)	ND[b]	**D10** (*E. cloacae*)	**F11** (*E. cloacae*)
3	**A29** (G^-, rod-shaped cell)	**C29** (*E. cloacae*)	**E23** (*E. cloacae*)	ND[b]	ND[b]	**F13** (*E. cloacae*)
5	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
7	ND[b]	ND[b]	ND[b]	**B45** (G^-, rod-shaped cell)	ND[b]	ND[b]
9	ND[b]	ND[b]	ND[b]	**B47** (*E. cloacae*)	ND[b]	ND[b]
11	ND[b]	**C52** (*E. cloacae*)	ND[b]	**B55** (G^-, rod-shaped cell)	**D52** (*E. cloacae*)	ND[b]
13	**A68** (G^-, rod-shaped cell)	**C60** (*E. cloacae*)	ND[b]	**B69** (G^-, rod-shaped cell)	ND[b]	ND[b]
17	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
25	ND[b]	**C70** (G^-, rod-shaped cell)	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]
33	**AT8** (*E. cloacae*)	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]	ND[b]

[a]Histamine-forming bacteria: *S.* = *Staphylococcus*
E. = *Enterobacter*

[b]ND = Not detected from all isolates tested



รูปที่ 27a-b การเปลี่ยนแปลงจำนวน Halobacterium ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ(b)

5. องค์ประกอบของกรดอะมิโนและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของน้ำปลา

ปริมาณกรดอะมิโนของน้ำปลาชนิดต่างๆ แสดงดังในตารางที่ 6 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของตัวอย่างน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้องมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ระหว่าง 9,350-9,600 mg/100mL โดยสูงกว่าตัวอย่างหมักที่ 40°ซ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 6,000 – 7,000 mg/100mL ผลดังกล่าวสอดคล้องกับค่า α-amino acids (รูปที่ 17a,b และ 18a,b) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการหมักที่อุณหภูมิห้องใช้ระยะเวลานานกว่าที่ 40°ซ จึงทำให้เกิดการย่อยสลายของกรดอะมิโนโดยสมบรูณ์ สำหรับตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องนั้น ปริมาณกรดอะมิโนไกลซีน อะลานีน ซีรีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสหวานมีปริมาณใกล้เคียงกันทั้ง 3 ตัวอย่าง (Fuke, 1994) นอกจากนี้กลูทาเมทและแอสพาเตทซึ่งหากอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมแล้วจะให้รสชาดอร่อย (umami) ก็มีปริมาณใกล้เคียงกัน ทอรีนเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนซิสติอีน ทอรีนมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของสมอง การทำงานของน้ำดี (bile acid) และสายตา จากการศึกษานี้พบว่าปริมาณทอรีนในน้ำปลาที่มีความสดต่างกันมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ ปริมาณฮีสติดีนในตัวอย่างน้ำปลาหมักจากปลาเน่า (16h) มีค่าน้อยกว่าตัวอย่างหมักจากสด (F และ 8h) ทั้งนี้อาจเนื่องจากวัตถุดิบ (16h) เกิดการเน่าเสีย และมีแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจำนวนมาก จึงทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ใช้ฮีสติดีนเป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นฮีสตามีน ในตัวอย่างน้ำปลาหมักที่ 40°ซ นั้น มีปริมาณฮีสติดีนน้อยกว่าตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะที่ 40°ซ นั้นฮีสติดีนถูกเปลี่ยนไปเป็นฮีสตามีนได้มากกว่าที่หมักที่อุณหภูมิห้อง จึงทำให้มีปริมาณฮีสติดีนอิสระเหลืออยู่น้อยกว่า ประกอบกับการย่อยสลายโปรตีนที่ 40°ซ นั้นอาจเกิดได้ไม่มากเท่ากับการหมักที่อุณหภูมิห้อง ส่วนไดเปปไทด์แอนเซอรีน (anserine)และคาร์โนซีน(carnosine)ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเซลล์(antioxidant) และทำหน้าที่รักษาระดับ pH ให้คงที่ (buffer capacity) (Boldyrev and Sevein, 1990) ไดเปปไทด์ทั้งสองนี้พบได้ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อ โดยพบแอนเซอรีนในกล้ามเนื้อปลาซาลมอนประมาณ 22 μmol/g muscle แต่จากตารางที่ 6 นั้นคาร์โนซีนมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันไม่ว่าจะใช้วัตถุดิบที่มีความสดต่างกันอย่างไร หรือหมักที่อุณหภูมิใดก็ตาม แต่จะพบว่าปริมาณแอนเซอรีนในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักจากปลาเน่า (16h) ที่อุณหภูมิห้องมีค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ Ruitz-Capillas (2002) พบว่า เมื่อเก็บปลา hake *(Merluccius merluccius)*ในน้ำแข็งเป็นระยะเวลานานขึ้น ปริมาณแอนเซอรีนลดลงแต่ปริมาณ methyl histidine ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของแอนเซอรีนจะเพิ่มขึ้น จากงานวิจัยนี้ตรวจไม่พบ methyl histidine ในตัวอย่างน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้องไม่ว่าที่ระดับความสดใด ๆ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 °ซ นั้นพบ methyl histidine แปรผกผันกับแอนเซอรีน แสดงว่าเกิดการแตกตัวหรือการย่อยสลายของแอนเซอรีนเป็น methyl histidine และ β-alanine ดังนั้นอุณหภูมิในการหมักเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อองค์ประกอบ

ของกรดอะมิโนนอกเหนือจากคุณภาพของวัตถุดิบ จากการศึกษานี้ยังไม่สามารถระบุถึงสาเหตุแน่ชัดถึงการเพิ่มขึ้นของแอนเซอรีนในตัวอย่างปลา(16h) หมักที่อุณหภูมิห้องได้ ว่ามาจากการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลา หรือเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

สำหรับตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้องนั้นพบว่าน้ำปลาที่หมักจากปลาเน่า (16h) มีปริมาณกรดอะมิโนอาร์จีนีนและซิทรูลีน (citrulline) สูงกว่าน้ำปลาที่หมักจากปลาสด (F,8h) ในขณะที่ตัวอย่างหมักที่ 40°ซ นั้นผลเป็นตรงกันข้าม เนื่องจากปลาที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาชุดทดลองเดียวกัน ความแตกต่างของกรดอะมิโนที่อุณหภูมิทั้งสองอาจเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักและระยะเวลาที่ต่างกัน จากการย่อยสลายกรดอะมิโนตาม Kreb-Henseleit urea cycle นั้น กรดอะมิโนอาร์จีนีนจะถูกเปลี่ยนเป็น ออร์นิธีน (ornithine) และซิทรูลีน (citrulline) ซึ่งเป็นกลไกการกำจัดยูเรียของสิ่งมีชีวิต ปลาที่เน่าเสียอาจเกิดการเสื่อมสลายของโปรตีนเป็นกรดอะมิโนโดยเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาและจากจุลินทรีย์ ในกรณีของอาร์จินีนนั้นยังถูกเปลี่ยนเป็นออร์นิธีนซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยา decarboxylation แล้ว เกิดเป็นสารพิวทรีซีนซึ่งเป็นไบโอจีนิกเอมีนประเภทหนึ่ง เนื่องจากในการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาปริมาณกรดอะมิโนอิสระของวัตถุดิบจึงไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าคุณภาพความสดมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้ง 3 อย่างไร แต่ปริมาณที่ต่างกันในตัวอย่างน้ำปลาเมื่อหมักที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ นั้น แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก และการย่อยสลาย (hydrolysis) ที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ นั้นแตกต่างกัน การศึกษาในแนวลึกถึงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาจะทำให้เกิดความเข้าใจในบทบาทของเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพของน้ำปลาต่อไป

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของน้ำปลาหมักที่สภาวะต่างๆ (mg/100 mL)

Amino acids	RT Fermentation			40°C Fermentation		
	F	8h	16h	F	8h	16h
O-Phospho-L-serine	11.66	11.52	11.0	8.30	6.56	19.49
Taurine	156.59	148.87	150.7	147.35	116.32	133.42
O-Phosphoethanolamine	-	-	-	0.00	0.00	0.00
Urea	101.08	0.00	235.6	0.00	0.00	0.00
L-Aspartic Acid	581.77	567.42	568.8	319.17	276.77	323.86
Hydroxy-L-Proline	0.00	612.38	574.0	0.00	0.00	0.00
L-Threonine	611.74	612.38	574.0	394.84	321.60	369.64
L-Serine	498.67	502.35	387.2	287.16	283.58	296.36
L-Asparagine	22.92	18.92	0.00	0.00	18.40	54.25
L-Glutamic Acid	1176.53	1180.63	1144.6	733.74	571.42	679.43
L-Sarcosine	175.69	155.35	88.4	98.54	101.50	206.97
L-α-Aminoadipic Acid	86.69	72.64	42.3	48.68	37.00	80.45
L-Proline	355.02	343.30	269.2	244.15	202.15	278.33
Glycine	391.49	399.77	409.2	235.97	178.78	207.84
L-Alanine	831.92	836.31	839.6	594.18	466.48	539.82
L-Citrulline	44.93	125.32	766.4	572.04	50.49	34.71
L-α-Amino-n-butyric Acid	29.56	19.99	21.2	24.09	21.94	35.22
L-Valine	720.96	694.37	689.5	518.18	420.85	497.66
L-Cystine	105.21	67.26	66.7	74.39	63.32	78.28
L-Methionine	276.05	264.68	280.3	278.83	217.05	253.45
Cystathionine	45.24	31.76	34.4	0.00	754.51	49.93
L-Isoleucine	427.02	429.88	441.0	391.33	399.58	345.37
L-Leucine	468.49	461.31	478.6	533.68	0.00	455.38
L-Tyrosine	90.48	88.78	81.8	86.34	71.75	77.58
β-alanine	-	-	-	38.29	28.12	29.69
L-Phenylalanine	418.17	421.18	414.2	315.87	234.94	259.62

ตารางที่ 6 ต่อ

Amino acids	RT Fermentation			40°C Fermentation		
	F	8h	16h	F	8h	16h
L-Homocystine	5.86	5.96	8.8	-	-	-
L-β-Aminoisobutyric Acid	-	-	-	14.90	14.27	15.01
L-Homocystine	-	-	-	7.68	5.38	6.93
γ-Amino-n-butyric acid	0.00	4.01	0.00	-	-	-
Ethanolamine	19.99	19.92	15.9	20.68	17.11	21.10
Ammonium Chloride	314.50	339.82	594.3	439.58	217.34	226.37
δ-Hydroxylysine	32.42	9.05	22.8	29.33	8.12	9.56
L-Ornithine	12.38	21.87	38.5	38.02	9.99	6.76
L-Lysine	120.49	121.35	113.1	83.71	67.47	79.51
1-Methyl-L-Histidine	-	-	-	45.99	26.51	9.89
L-Histidine	568.12	567.32	419.7	299.53	322.12	387.51
3-Methyl-L-Histidine	-	-	-	19.77	0.00	0.00
L-Anserine	53.94	46.58	124.5	0.00	31.62	38.88
L-Carnosine	30.67	24.28	0.00	33.55	29.29	32.29
L-Arginine	808.64	730.51	30.8	44.94	444.49	542.02
Total	**9594.88**	**9353.67**	**9362.8**	**7022.78**	**6036.81**	**6683.21**

ตารางที่ 7 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำปลาหมักที่สภาวะต่างๆ

Sample	Total plate count (CFU/mL)	Yeast & molds (CFU/mL)
40°C/F	$1.5x10^2$	$1.5x10^2$
40°C/8h	$1.5x10^2$	$1.0x10^2$
40°C/16h	$1.0x10^2$	$1.5x10^2$
RT/F	$1.0x10^2$	$3.33x10^2$
RT/8h	33	$1.66x10^2$
RT/16h	$2.7x10^2$	$1.33x10^2$

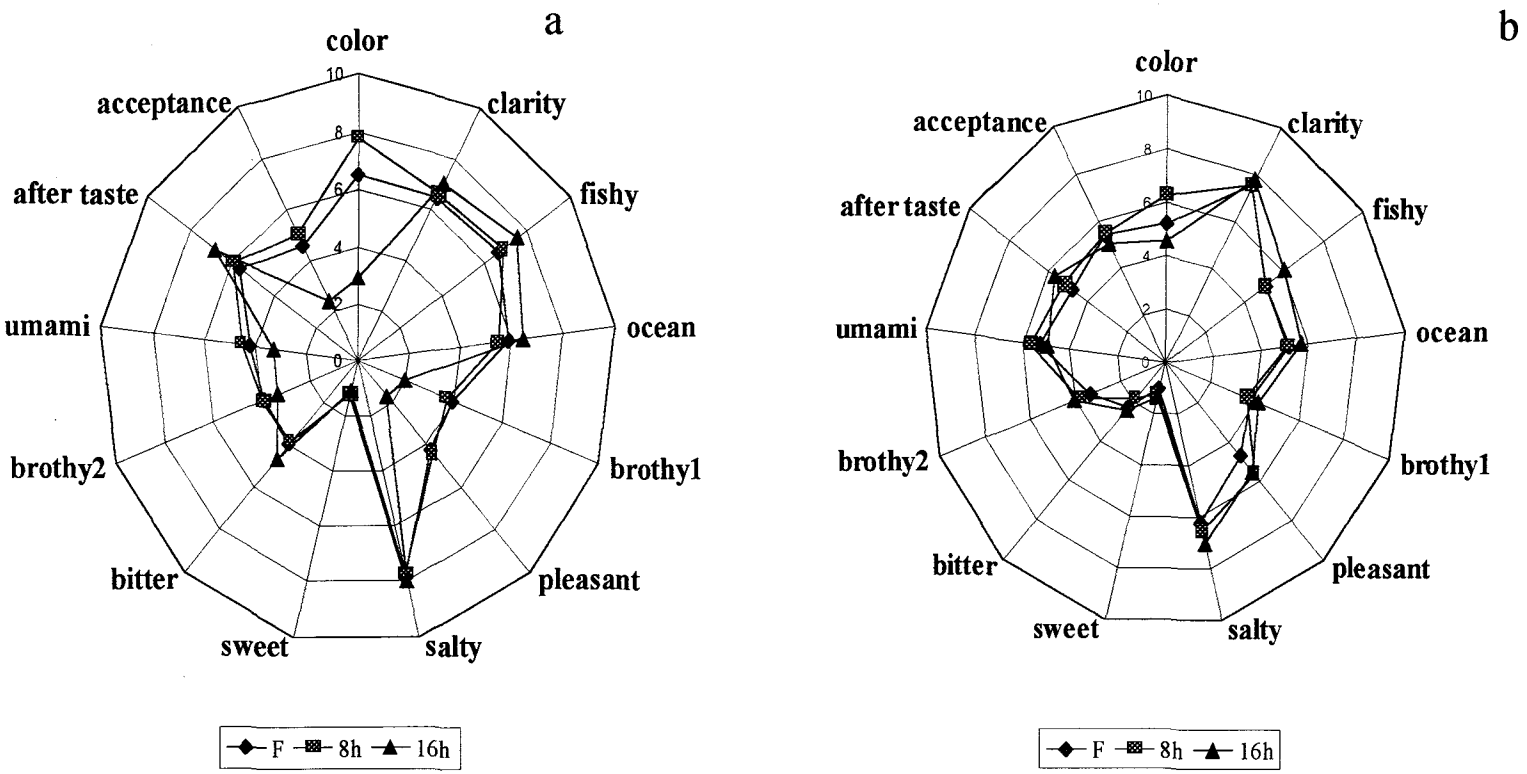
40°C, RT = fermentation at 40°C and room temperature respectively, F = Fresh, 8h = left at 35°C for 8h, 16h = left at 35°C for 16h

คุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์น้ำปลาหมักที่ 2 อุณหภูมิแสดงดังตารางที่ 7 ปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์กฎหมายกำหนด ความเข้มข้นเกลือที่สูงส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ชอบเค็มและทนเค็มอยู่รอดเท่านั้น และจากการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus, Clostridium perfringens,* Total coliform, Fecal coliform, *Salmonella spp., Staphylococcus aureus* และ *Vibrio spp.* ในน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่างนั้น ปรากฏว่าไม่พบจุลินทรีย์ที่ก่อโรค แม้ในตัวอย่างหมักจากปลาเน่า (16h) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคด้วยปริมาณเกลือสูง 20%

สำหรับการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เมื่อนำน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่าง ให้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนแล้วประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสได้ผลดังรูปที่ 27a,b ผู้ทดสอบตรวจพบกลิ่นคาวปลาจากน้ำปลาที่หมักจากปลาเน่า (16h)ได้มากกว่าตัวอย่างอื่น และยังพบว่ามีกลิ่นหอมน้ำปลา (pleasant) น้อยกว่าตัวอย่างที่หมักจากปลาสด ($p<0.05$) เนื่องจากตัวอย่างที่หมักจากปลาเน่ามีปริมาณแอมโมเนียสูงกว่าอีก 2 ตัวอย่าง นอกจากนี้ปริมาณไตรเมททิลเอมีนซึ่งเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นคาวปลา (Fukami et al., 2002) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักจากปลาเน่า มีสูงถึง 64.8 mg/100ml ในขณะที่ตัวอย่าง F และ 8h มีค่า ไตรเมททิลเอมีนเท่ากับ 22.7 และ 23.7 mg/100ml ตามลำดับ Fukami et al., (2002) รายงานว่า 2-ethylpyridine และ dimethyl trisulfide เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นเหม็นคาว และกลิ่นเน่าเสีย (fecal) ในตัวอย่างน้ำปลา จึงอาจสันนิษฐานได้ว่าในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักจากปลาเน่า(16h) มีสารประกอบ 2-ethylpyridine และ dimethyl trisulfide สูงกว่าตัวอย่าง F และ 8h ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดกลิ่นรสซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับ ส่วนรสชาติอร่อย (umami) ของน้ำปลา 16h ก็มีค่าน้อยกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำปลาที่หมักจากปลาสด ซึ่งสอดคล้องกับผลของกรดอะมิโน (ตารางที่ 6) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันในตัวอย่างน้ำปลาทั้งสาม ผู้ทดสอบตรวจพบความแตกต่างของสีที่ผลิตจากวัตถุดิบที่มีความสดต่างกัน โดยตัวอย่างปลา 8h มีสีน้ำตาลแดงมากที่สุด รองลงมาคือปลาสด (F) และปลาเน่า (16h) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการวัดค่าสีจากเครื่อง spectrophotometer อาจใช้เป็นดัชนีบ่งบอกความเข้มของสีน้ำปลาได้ดี อันจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพน้ำปลาในระดับอุตสาหกรรม เมื่อพิจารณาการยอมรับรวมของทั้งสามตัวอย่างพบว่าตัวอย่าง 16h ได้รับการยอมรับน้อยกว่าตัวอย่างอื่น ($p<0.05$) ส่วนตัวอย่าง F และ 8h ได้รับการยอมรับไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ซึ่งเป็นลักษณะของกลิ่นเน่าเสียที่ยังคงปรากฏอยู่ในน้ำปลา 16h เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ทดสอบไม่ยอมรับ ดังนั้นการผลิตน้ำปลาให้ได้คุณภาพดีควรใช้วัตถุดิบที่มีความสดเพื่อไม่ให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ (off-flavor)

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างน้ำปลาหมักที่ 40°ซ ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ยกเว้นสีของผลิตภัณฑ์ โดยผู้ทดสอบสังเกตเห็นว่าน้ำปลาที่หมักจากปลา 8h มีสีอมน้ำตาลแดงมากที่สุด และน้ำปลาจากปลาเน่า (16h) มีสีน้ำตาลแดงอ่อนสุด ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 440 nm จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าปลาที่มีระดับการเน่าเสียมากจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีอ่อนเนื่องจากปริมาณกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับ Maillard browning ถูกเปลี่ยนเป็นสารไบโอจีนิกเอมีน นอกจากนี้พบว่า รสอร่อย (umami) ของทั้ง 3 ตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกัน เนื่องจากกรดอะมิโนของทั้งสามตัวอย่างนี้มีค่าใกล้เคียงกัน เป็นที่น่าสังเกตว่ากลิ่นคาวปลา และกลิ่นหอมน้ำปลาของทั้งสามตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยเฉพาะกลิ่นหอมน้ำปลาของตัวอย่าง 16h มีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ผู้ทดสอบไม่สามารถตรวจพบกลิ่นเน่าเหม็นในผลิตภัณฑ์ ดังเช่นที่ตรวจพบในตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณไตรเมทธิลเอมีนของทั้งสามตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างที่หมักที่อุณหภูมิห้อง แต่มีปริมาณแอมโมเนียน้อยกว่า (รูปที่ 16a,b) กรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) เช่น acetic propionic isovaleric และ phenylacetic acid มีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลาเช่นกัน โดยสารเหล่านี้จะมีปริมาณน้อยในน้ำปลาที่หมักจากปลาสด (McIver et al., 1982) การหมักที่ 40°ซ อาจทำให้กรดระเหยเหล่านี้ลดลง จึงทำให้ตัวอย่างทั้งสามมีกลิ่นคาวและกลิ่นหอมที่ใกล้เคียงกัน ผู้ทดสอบจึงไม่สามารถตรวจพบกลิ่นเน่าเหม็น (Unpleasant) ในน้ำปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ปลาเน่า (16h) การยอมรับโดยรวมของทั้งสามตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) จะเห็นได้ว่าคุณภาพโดยรวมของน้ำปลานั้นขึ้นอยู่กับทั้งกลิ่นและรสซึ่งกำหนดโดยปริมาณกรดอะมิโนและสารระเหย แม้ว่าน้ำปลาจะมีปริมาณกรดอะมิโนสูงซึ่งมีแนวโน้มว่าจะทำให้มีรสอร่อย แต่หากมีสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี เช่นกลิ่นฉุนหรือกลิ่นคาวก็จะทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ



รูปที่ 28a-b คุณลักษณะทางประสามสัมผัสของน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b)

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปและข้อเสนอแนะ

คุณภาพความสดของวัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลา ปลากะตักควรเก็บในน้ำแข็ง (0°ซ) หลังการจับและระหว่างขนส่ง โดยฮีสตามีนเพิ่มเป็น 2 mg/100g ภายใน 15 วัน ส่วนการเก็บปลาที่อุณหภูมิต่ำ (15°ซ) จะสามารถเก็บรักษาปลาให้ปริมาณฮีสตามีนไม่เกิน 20 mg/100 g ภายใน 32 ชั่วโมง ส่วนปลาเก็บที่อุณหภูมิสูงนั้น (35°ซ) ไม่ควรเก็บเกิน 8 ชั่วโมง ฮีสตามีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลากะตักได้ดีกว่า TMA, TVB และ pH เนื่องจากมีปริมาณเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเน่าเสีย

แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในปลากะตักได้สูง คือ *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus xylosus* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนในระบบจำลอง (model system) อาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงถึง 765.9-2,030.2 ppm ส่วน *Citrobacter youngae* และ *Enterobacter cloacae* สร้างฮีสตามีนได้เพียง 13.9-45.5 ppm เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนได้สูงสามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5% pH 5 และอุณหภูมิ 35°ซ เชื้อดังกล่าวไม่สามารถเจริญและสร้างฮีสตามีนได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 20-25%

ฮีสตามีนเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้องตลอดระยะเวลา 1 ปี ส่วนการหมักที่ 40°ซ มีผลให้ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 13 สัปดาห์โดยไม่ขึ้นกับคุณภาพความสดของวัตถุดิบ เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนที่พบในน้ำปลาคือ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 66.03 ppm ภายใน 20-24ชั่วโมง อัตราการย่อยสลายโปรตีนที่ 40°ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง แต่ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (หมัก 13 สัปดาห์) มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยกว่าน้ำปลาหมักที่อุณหภูมิห้อง (52 สัปดาห์) ปลาที่มีระดับการเน่าเสียสูงจะได้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดและกรดอะมิโนสูงกว่าปลาสดเฉพาะในระยะต้นของการหมักเท่านั้น (10 สัปดาห์แรกของการหมักที่อุณหภูมิห้อง และ 4 สัปดาห์แรกของการหมักที่ 40°ซ) การใช้ปลาที่เน่าเสียจะไม่ช่วยเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา

เมื่อใช้ปลาที่มีคุณภาพความสดต่ำหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง จะทำให้น้ำปลาที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดี (unpleasant) ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบ ในขณะที่คุณภาพความสดไม่มีผลต่อกลิ่นรสของน้ำปลาเมื่อหมักที่ 40°ซ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิสูงสามารถลดปริมาณสารระเหยเช่นแอมโมเนียหรือสารที่ให้กลิ่นรสไม่ดีในผลิตภัณฑ์ได้

เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ มีหลายขั้นตอนจึงต้องใช้เวลามาก ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นจึง

ควรศึกษาและพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อดังกล่าวโดยใช้เทคนิคทางด้าน DNA นอกจากนี้ควรศึกษาการเกิดไบโอจีนิกเอมีนตัวอื่นๆ เมื่อปลาเกิดการเน่าเสีย และในระหว่างกระบวนหมักน้ำปลา เพื่อจะได้มีแนวทางในการควบคุมปริมาณสารต่างๆ เหล่านั้นอย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

References

ปราณี ศรีสมบูรณ์ จันทร์ฉาย แจ้งสว่าง และ มาลี เจริญวิทย์วรกุล. 2538. การศึกษาฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาบางชนิด. อาหาร. 25(1) มกราคม-มีนาคม: 35-42.

ไพโรจน์ ซ้ายเกลี้ยง 2533. การประมงปลากะตัก วารสารการประมง. 43(5): 349-351

อารีย์ มีสวัสดิ์ 2542. การย่อยสลายโปรตีนน้ำปลาในระดับอุตสาหกรรม วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หมาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

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

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

Andrews, W.H. and Messer, J. 1990. Microbiological Methods. In "*Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*", K. Helrich (ed.) p. 425-497. AOAC International, Arling, VA.

AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*, 16th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC International, 1998. *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg.

Atlas, R.M. and Parks, L.C. 1997. *Handbook of Microbiological Media.* CRC Press, Boca Raton.

Boldyrev, A. and Sevein, S.E. 1990. The histidine containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties, and biological significance. Advances in Enzyme Regulation. 30: 175-188.

Brillantes, S., Paknoi, S., and Totakien, T. 2002. Histamine formation in fish sauce production. J. Food Sci. 67(6): 2090-2094.

Du, W.X., Lin, C.M., Phu, A.T., Cornell, J.A., Marshall, M.R., and Wei, C.I. 2002. Development of biogenic amines in yellow fin tuna (*Thunnus albacares*): effect of

storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. J. Food Sci. 67(1): 292-301.

FDA, 1996. Decomposition and histamine in raw, frozen tuna and mahi-mahi, canned tuna, and related species. Compliance Policy Guides. 7108.240.Sec. 540.525.

Fields, R. 1972. The rapid determination of amino groups with trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS. In *Methods in Enzymology, Vol. XXV*, C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, (Eds). p. 464-468, Academic Press, New York.

Fujii, T., Kurihara, K. and Okuzumi, M. 1994. Viability and histidine decarboxylase activity of halophilic histamine forming bacteria during frozen storage. J. Food Prot. 57: 611-613.

Fukami, K., Ishiyama, S., Yaguramaki, H., Masuzawa, T., Nabeta, Y., Endo, K., and Shimoda, M. 2002. Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. J. Agric. Food Chem. 50(19): 5412-5416.

Fuke, S. 1994. Taste-active components of seafoods with special reference to umami substances. In "*Seafoods:Chemistry, Processing Technology and Quality*". F. Shahidi and J.R. Botta (Eds.), p. 115-139. Blackie Academic.& Professional, New York.

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

Guirard, B.M. and Snell, E.E. 1987. Purification and properties of pyridoxal-5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes*. J. Bact. 169(9): 3963-3968.

Hernandez-Herrero, M.M.m Roig-Sagues, A.X., Rodriguez-Jerez, J.J., and Mora-Ventura, M.T. 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus*). J. Food Prot. 62(5): 509-514.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore.

Joosten H.M.L.J. and Nunez, M. 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. App. Environ. Microbiol. 62(4): 1178-1181.

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

Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey. M.T., Field, K.G., Wei, C.I., and An, H. 2002. Histamine production by *Morganella morganii* in mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. J. Food Sci. 67(4): 1522-1528.

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

Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. p. 140-601. Williams & Wilkins, Baltimore.

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

Lonvaud-Funnel, A. and Joyeux, A. 1994. Histamine porduction by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacterio. 77(4): 401-407.

Lopez-Sabater, E.I., Rodribuez-Jerez, J.J., Roig-Sagues, A.X., and Mora-Ventura, M.A.T. 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. J. Food Prot. 57(4): 318-323.

I ɔpez-Sabater, E.I., Rodribuez-Jerez, J.J., Hernadez-Herrero, M., Roig-Sagues, A.X., and Mora-Ventura, M.T. 1996. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). J. Food Prot. 59(2): 167-174.

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

McIver, R.C., Brooks, R.I., and Reineccius, G.A. 1982. Flavor of fermented fish sauce. J.Agric. Food Chem. 30: 1017-1020.

Middlebrooks, B.L., Toom, P.M., Douglas, W.L., Harrison, R.E., and Mcdowell, S. 1988. Effect of storage time and temperature on the microflora and amine delvopment in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). J. Food Sci. 53(4): 1024-1029.

Morii, H., Cann, D.C., and Taylor, L.Y. 1988. Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperature. Nippon Suisan Gakkaishi. 54(2): 299-305.

NIPC, 1993. Fish Products Inspection Manual. Canada.

Niven, C.F., Jeffrey, M.B., and Corlett, D.A. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41: 321-322.

Okuzumi, M., Okuda, S., and Awano, M. 1981. Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47(12): 1591-1598.

Okuzumi, M., Yamanaka, H., Kubozuka, T., Ozaki, H., and Matsubara, K. 1984. Changes in numbers of histamine forming bacteria on/in common mackerel stored at various temperatures. . Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50(4): 653-657.

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

Rodriguez-Jerez, J.J., Lopez-Sabater, E.I., Hernandez-Herrero, M.M., and Mora-Ventura, M.T. 1994b. Histamine, putrescine, and cadaverine formation in Spanish semipreserved anchovies as affected by time/temperature. J. Food Sci. 59(5): 993-997.

Rodriguez-Jerez, J.J., Lopez-Sabater, E.I., Roig-Sagues, A.X., and Mora0Ventura, M.T. 1994c. Histamine, cadaverine, and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies. J. Food Sci. 59(5): 998-1001.

Roig-Sagues, A.X., Hernandez-Herrero, M., Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., and Mora-Ventura, M.T. 1996. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salchichon, a Spanish cured sausage. J. Food Prot. 59(5): 516-520.

Ruiz-Capillas, C. and Moral, A. 2002. Relation between the free amino acids, anserine and the total volatile basic nitrogen produced in muscle of hake (*Merluccius merluccius, L.*) during iced storage. J. Food Biochem. 26(1): 37-48.

Ryder, J.M., Buisson, D.H., Scott, D.N., and Fletcher, G.C. 1984. Storage of New Zealand jack mackerel (*Trachurus novaezelandiae*) in ice: chemical, microbiological and sensory assessment. J. Food Sci. 49: 1453-1456, 1477.

Ryser, E.T., Marth, E.H., and Tylor, S.L. 1984. Histamine production by psychrotrophic Pseudomonads isolated from tuna fish. J. Food Prot. 47(5): 378-380.

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

Satomi, M., Kimura, B., Mizoi, M., Sato, T., and Fujii, T. 1997. *Tetragenococcus muriaticus sp.* nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. Inter. J. System. Bact. 47: 832-836.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp, M.E., and Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. p. 999-1260. Williams & Wilkins, Baltimore.

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

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

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

Vaaler, G.L. and Snell, E.E. 1989. Pyridoxal 5'-phosphate dependent histidine decarboxylase: overproduction, purification, biosynthesis of soluble site-directed mutant proteins, and replacement of conserved residues. Biochem. 25: 7306-7313.

Veciana-Nogues, M.T., Vidal-Carou, M.C., and Marine-Font, A. 1990. Histamine and tyramine during storage and spoilage of anchovie, *Engraulis encrasicholus*: relationships with other fish spoilage indicators. J. Food Sci. 55(4): 1192-1193, 1195.

Yasunami, K. and Echigo, T. 1991. Isolation of salt tolerant histamine-forming bacteria from commercial rice bran pickles of sardines. Nippon Suisan Gakkai. 57(9): 1723-1728.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์

1. Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม		
Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

2. Safranin (Gram stain)

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

ภาคผนวก ข น้ำยาเคมี

1. Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

2. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

3. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อย		
จนกระทั่ง Iodine ละลายหมด		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร
เก็บไว้ในขวดสีชา		

4. Sodium-phosphate buffer

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2 M Monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.12H_2O$= 31.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 53.65 กรัม หรือ 71.7 กรัมตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.0	90.0	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

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

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1.0 กรัม

น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

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

ภาคผนวก ค. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. AP broth

Peptone	10 กรัม
NaCl	10 กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000 มิลลิลิตร

pH 8.5±0.2

2. Barid-Parker medium (Egg tellurite glycine pyruvate agar)

อาหารสำเร็จ (Merck)

Basal medium เติม Bacto EY tellurite enrichment

3. Bismuth sulfite (BS) agar

Polypeptone หรือ peptone	10.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Na_2HPO_4	4.0	กรัม
$FeSO_4$	0.3	กรัม
$Bi_2(SO_3)$ indicator	8.0	กรัม
Brilliant green	0.025	กรัม
Agar	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.6 ± 0.2

ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

4. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth

Peptone	10	กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร
Lactose	10	กรัม

เติมสารละลาย 200 มิลลิลิตร (ในน้ำ) ซึ่งมี Dehydrated oxgall หรือ oxbile 20 กรัม (pH 7.0-7.5)

เติม 0.1% brillant green	13.3	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 1

แบ่งบรรจุ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

5. Carbohydrate (sugar) fermentation test medium

Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Carbohydrate (sugar)	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

เตรียม carbohydrate แยกโดยทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองส่วนประกอบอื่นให้นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

6. EC broth

Trypticase หรือ Tryptose (Pancreatic digest of casein)	20	กรัม
Bacto bile salt No.3 หรือ Bile salt mixt.	1.5	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
K_2HPO_4	4.0	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 6.9 $\pm$ 1

แบ่งบรรจุ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

7. EMB agar อาหารสำเร็จ (Difco)

8. Halobacterium medium

NaCl	80.0	กรัม
$MgSo_4.7H_2O$	10.0	กรัม
Caseine hydrolysate	5.0	กรัม
KCl	5.0	กรัม
Disodium citrate	3.0	กรัม
KNO_3	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

pH 7.2-7.4 ที่ 25°ซ

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.2-7.4 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วจึงเติม agar หลอมให้ agar ละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

9. Histamine evaluation broth (HEB)

Tryptone	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.25	กรัม
Histidine-HCl	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

pH 5.7

10. Lauryl sulphate trypotse broth

Trypticase หรือ Tryptose	20.00	กรัม
(Pancrestic digest of casein)		
Sodium chloride	5.00	กรัม
Lactose	5.00	กรัม
Dipotassium phosphate	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.75	กรัม
Sodium lauryl sulphate	0.10	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	กรัม

pH 6.8 $\pm$ 1

แบ่งบรรจุ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

11. Lead acetate agar

Proteose peptone	20.0	กรัม
Disodium phosphate	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Lead acetate	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
D-mannitol	10.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 0.1

แบ่งบรรจุ 255 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที เติม 12.5 มิลลิลิตร Egg yolk emusion และ 2.5 มิลลิลิตร Polymyxin B solution ลงในแต่ละ 225 มิลลิลิตรของอาหาร

13. M-FC agar

Tryptose	10.0	กรัม
Proteose peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Lactose	12.5	กรัม

Bile salts No.3	1.5	กรัม
Anilline blue	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

pH 7.4 ± 0.1

14. Motility test medium

Tryptose	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Bacto agar	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

15. Niven medium

Tryptone	5.0	กรัม (0.5%)
Yeast extract	5.0	กรัม (0.5%)
L-histidine	1.0	กรัม (บางสูตร 2.7%)
NaCl	5.0	กรัม (0.5%)
$CaCO_3$	1.0	กรัม (0.1%)
Agar	20.0	กรัม (2.0%)
Bromocresol purple	0.06	กรัม (0.006%)
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 5.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

16. Nutrient gelatin

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

17. Plate count agar (PCA ,Difco)

PCA สำเร็จรูป 23.5 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2 ก่อนใช้ให้เติมสารปฏิชีวนะ Chlortetracyclin-HCL และ Chloramphenicol 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

18. Peptone Water (Dilutent, 0.1%)

Peptone	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Peptone ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

19. Skimmed milk agar

Skimed milk	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4$	Trace	
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

20. Starch agar

Soluble starch	2.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

21. TCBS Agar (Difco)

TCBS Agar สำเร็จรูปชั่งมา 89 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร pH 8.6 ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

22. Triple sugar iron agar

Polypeptone	20.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Ferrous ammonium sulfate	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	13.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

23 Tryptone broth

Tryptone	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

24. Trypticase (Tryptic) soy broth ที่มี 10% Sodium chloride และ 1% Sodium pyruvate

Trypticase หรือ Tryptose (pancreatic digest of casein)	17.0	กรัม
Phytone (papaic digest of soya meal)	3.0	กรัม
NaCl	100.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium pyruvate	10.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.3 $\pm$ 0.2

แบ่งบรรจุ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

25 Tryptone bile agar (TBA)

Tryptone	20.0	กรัม
Bile salt No.3	1.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ± 0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

26. Tryptose-sulfite-cycloserine agar (TSC)

Tryptose	15.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium metabisulfite	1.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.6 ± 0.1

แบ่งบรรจุ 10 มิลลิลิตรต่อหลอดใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเท plate เติม 20 มิลลิลิตรของ 0.5% Filter-sterilized solution ของ D-Cycloserine ลงใน 250 มิลลิลิตร TSC

สำหรับ Egg yolk-containing plates เติม 20 มิลลิลิตรของ 50% Egg yolk emulsion ลงใน 250 มิลลิลิตร TSC

27. Tween-80 agar

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
Tween 80	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

28. VRBG อาหารสำเร็จรูป (Difco)

29. Xylose lysine desoxycholate agar (XLD)

Xylose	3.75	กรัม
L-lysine	5.0	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.4

ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

30. Glucose Oxidation-Fermentation medium (OF-medium)

Peptone	2	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Glucose	5	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
Bromothymol blue	0.03	กรัม
Agar	3	กรัม
เติมน้ำจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.1

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ง การสร้างฮิสตามีน และการเจริญในอาหาร Histamine evaluation broth (HEB) และลักษณะทางสัณฐานของเซลล์และทางสรีระวิทยาบางประการของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างจากกระบวนการหมักน้ำปลา

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm.)	Growth (A 600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
0	1	(16)	+	Cocci	1.0x1.0	0.100	0.33	6.49	-	-	-
	2	(26)	+	Rods	0.5x1.5-2.0	Weak / Poor growth			+	-	+
	3	(29)	+	Cocci	0.9x0.9	0.134	0.25	6.50	-	-	-
	4	(35)	+	Rods	1.0x1.5	0.234	0.02	-	-	-	-
	5	(39)	+	Rods	0.5x1.5-3.0	0.604	0.165	-	-	+	-
1	6	A3	+	Cocci	0.8-0.9x0.8-0.9	0.314	0.40	6.50	-	+	-
	7	B3	+	Rods	1.0x2.5-4.0	0.206	0.10	-	+	-	+
	8	C3	+	Cocci/Oval	0.8x0.8-1.0	0.196	0.56	6.57	-	+	-
	9	E1	+	Cocci	0.8x0.8	66.029	0.22	6.56	-	-	-
	10	A7	-	Rods	0.5x1.0-1.2	7.295	0.70	-	-	-	-
2	11	B4	+	Rods	0.7x1.2	0.219	0.49	-	-	-	-
	12	C11	-	Rods	0.5x1.0-1.2	5.201	0.54	-	-	-	-
	13	HC4	+	Cocci	1.0x1.0	0.209	0.08	6.48	-	-	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm.)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
2	14	D10	-	Rods	0.5x1.0-1.5	6.754	0.40	-	-	-	-
	15	E7	-	Rods	0.5x0.8-1.0	8.664	0.60	-	-	-	-
	16	HE3	+	Rods	0.6-0.8x2-3.0	0.162	0.195	-	+	+	+
	17	F3	-	Rods	1.0x1.2-1.5	7.769	0.68	-	-	-	-
	18	F11	-	Rods	0.5x1.0-1.5	7.075	0.68	-	-	-	-
3	19	A29	-	Rods	0.5x1.0	7.615	0.66	-	-	-	-
	20	A32	+	Rods	0.9x1.0-1.5	0.170	0.50	-	-	-	-
	21	A33	+	Rods	1.0x1.5-3.0	0.185	0.45	-	-	-	-
	22	B20	+	Cocci	0.8x0.8	0.233	0.29	6.49	-	+	-
	23	C29	-	Rods	0.5x1.0-1.5	6.671	0.37	-	-	-	-
	24	D23	+	Rods	0.8x1.0-2.0	0.189	0.16	-	-	-	-
	25	HD6	+	Rods	0.6x1.5-3.0	0.175	0.11	-	+	-	-
	26	E23	-	Rods	0.5x1.0-1.5	8.016	0.44	-	-	-	-
	27	HE4	+	Rods	0.9x2.0-5.0	0.250	0.135	-	+	-	+
	28	F13	-	Rods	0.5x1.0	7.500	0.66	6.30	-	-	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
	29	F15	+	Cocci	0.8x0.8	0.223	0.165	-	-	+	-
5	30	A36	+	Rods	1.0x2.0-4.0	0.325	0.135	-	+	-	-
	31	A40	+	Rods	0.6-0.8x1.5-2.0	0.239	0.14	-	-	-	+
	32	HA14	+	Rods	0.8x2.0-3.0	0.157	0.14	-	+	+	+
	33	B31	+	Rods	0.6x2.0-4.5	0.259	0.24	-	+	+	+
	34	HB5	+	Rods	0.7x2.0-3.0	0.148	0.14	-	+	+	+
	35	HC15	+	Rods	0.8x2.0-4.0	0.169	0.21	-	+	-	+
	36	D34	+	Rods	0.8x1.0-2.0	0.285	0.09	-	+	-	+
	37	E31	+	Rods	0.7x1.0-2.0	0.240	0.07	-	+	-	-
	38	F24	+	Rods	0.6x1.0-1.5	0.367	0.60	6.27	+	-	-
	39	F25	+	Rods	0.6-1.0-1.5	0.225	0.115	5.79	+	-	-
	40	G3	+	Rods	0.8x2.0-4.0	0.160	0.50	-	+	+	-
	41	HG4	+	Rods	0.6x1.0-3.0	0.111	0.115	-	+	-	+
	42	I1	+	Rods	0.8x5.0-8.0	0.199	0.08	-	+	-	-
	43	I2	+	Rods	1.0x2.0-2.5	0.104	0.16	-	-	+	-

Fish sauce fermentation time (week)	No	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
5	44	HI5	+	Cocci	1.0x1.0	0.157	0.02	6.71	-	-	-
	45	J1	+	Rods	0.3x2.5-3.0	0.100	0.125	-	+	-	-
	46	HJ2	+	Cocci	1.0x1.0	0.127	0.80	6.70	-	-	-
7	47	A44	+	Rods	0.5-0.8x1.0-3.0	0.162	0.21	5.53	+	+	-
	48	HA19	+	Rods	0.9-1.0x2.0-3.0	0.298	0.115	-	+	-	+
	49	B38	+	Rods	0.6x1.5-2.0	0.133	0.195	5.48	+	+	-
	50	B45	-	Rods	0.6x1.0-1.2	3.768	0.60	6.28	-	-	-
	51	C37	-	Rods	0.6x1.2-2.0	Weak / Poor growth			-	-	-
	52	C41	+	Rods	0.8-1.0x1.0-4.0	0.474	0.16	5.52	-	+	+
	53	HC16	+	Rods	0.8x2.0-4.0	0.103	0.075		+	-	+
	54	D37	+	Rods	0.6x1.5-4.0	0.160	0.15	5.45	-	-	-
	55	D38	+	Rods	0.6x1.0	0.354	0.06	6.38	-	-	-
	56	HD13	+	Rods	1.0x2.0-4.0	0.186	0.06	-	+	-	+
	57	E38	+	Rods	0.6x1.0-2.5	0.275	0.23	6.11	-	+	+
	58	HE16	+	Cocci	0.8-1.0x0.8-1.0	0.154	0.13	6.52	-	-	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
7	59	F37	-	Rods	0.5x1.0	0.613	0.46	6.36	-	-	-
	60	HF17	+	Cocci	0.5x0.5	0.145	0.17	6.55	-	-	-
9	61	A53	+	Rods	0.5x1.0-1.5	0.101	0.21	5.47	-	-	-
	62	B47	-	Rods	0.6x1.5	4.941	0.46	6.36	-	-	-
	63	C43	+	Rods	0.6-0.7x1.5-3.0	0.105	0.41	-	-	+	-
	64	F39	+	Rods	0.5x2.0-3.0	0.116	0.06	-	-	+	-
11	65	A61	+	Rods	0.5-0.6x1.0-1.5	0.149	0.15	6.48	-	-	-
	66	B55	-	Rods	0.6x1.0-1.5	3.793	0.59	-	-	-	-
	67	HB18	+	Cocci	1.0x1.0	0.149	0.14	-	-	-	-
	68	C52	-	Rods	0.5x1.0	7.836	0.11	-	-	-	-
	69	HC22	+	Cocci	0.8x0.8	0.138	0.30	6.52	-	-	-
	70	D52	-	Rods	0.5x1.0	8.800	0.54	-	-	-	-
	71	E52	+	Rods	0.6x1.5-3.0	0.277	0.06	-	-	+	-
	72	F44	+	Rods	0.6x1.0-1.5	0.106	0.20	-	-	-	-
	73	F45	+	Rods	0.8-1.0x1.0-3.0	0.118	0.17	-	-	-	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
13	74	A68	-	Rods	0.5x1.0-1.5	9.079	0.25	-	-	-	-
	75	HA29	+	Rods	0.6-0.7x3.0-4.0	0.152	0.24	-	-	-	-
	76	B69	-	Rods	0.5x1.0	6.344	0.36	-	-	-	-
	77	C59	+	Rods	0.6-0.7x1.5-3.0	0.291	0.07	-	+	-	+
	78	C60	-	Rods	0.5x1.0	14.378	0.47	-	-	-	-
	79	D58	-	Rods	0.6x0.7-1.5	0.524	0.54	-	-	-	-
	80	E67	-	Rods	0.5x1.0-1.5	0.014	0.40	-	-	-	-
	81	F53	+	Rods	0.6-0.8x1.0-2.0	0.089	0.11	-	-	-	-
Salt	82	S3	+	Rods	1.0x2.0-3.0	0.097	0.135	-	+	-	-
	83	HS8	+	Rods	0.9x1.5-4.0	0.233	0.08	-	+	-	+
17	84	C64	-	Rods	0.6x1.0-2.0	0.365	0.54	-	-	-	-
	85	A75	+	Rods	0.5x1.5-2.5	0.331	0.125	-	-	+	+
	86	E68	-	Rods	0.5x0.6-1.0	0.373	0.115	-	-	-	-
25	87	A80	+	Rods	0.9x1.0-2.0	0.095	0.21	-	-	-	-
	88	A85	-	Rods	0.5x1.0	0.017	0.46	-	-	-	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
25	89	VA3	+	Rods	0.8x1.5-2.0	0.104	0.10	-	-	-	-
	90	HA28	+	Rods	1.0x1.5-2.5	0.158	0.17	-	-	-	-
	91	MA1	+	Rods	0.5x1.0-2.5	0.201	0.07	5.62	-	-	-
	92	MA2	+	Rods	0.6-0.8x1.0-7.0	0.201	0.07	5.62	-	-	-
	93	C70	-	Rods	0.5x1.0-1.5	3.327	0.52	-	-	-	-
	94	C72	+	Rods	0.5x1.0-2.0	0.208	0.135	-	-	+	-
	95	HC27	+	Rods	1.0x2.0-3.0	0.152	0.12	-	-	-	-
	96	MC1	+	Rods	1.2x3.5-5.0	No growth			+	-	+
	97	E73	+	Rods	1.0x3.0-7.0	0.111	0.27	-	-	-	-
	98	E78	+	Rods	0.4x1.5-3.0	0.165	0.185	-	-	+	-
	99	ME2	+	Rods	1.2x4.0-5.0	No growth			+	-	+
	100	ME3	+	Rods	0.8x1.0-3.0	0.199	0.20	5.60	-	-	-
33	101	AN2	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.193	0.21	6.49	-	-	-
	102	AN9	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.106	0.18	-	-	-	-
	103	AN15	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.115	0.18	-	-	-	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
33	104	AV1	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.167	0.25	-	-	-	-
	105	AV3	+	Rods	0.5x1.0-1.5	0.101	0.12	-	-	-	-
	106	AT8	-/+	Rods	1.0x1.5	7.110	0.49	-	-	-	-
	107	EN1	+	Cocci	1.0x1.0	0.135	0.68	6.49	-	-	-
	108	EN2	+	Rods	0.5-0.6x1.5-2.0	0.109	0.10	-	-	+	-
	109	EN7	+	Cocci	0.8-0.9x0.8-0.9	0.138	0.37	6.49	-	-	-
	110	EV1	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.147	0.40	6.51	-	-	-
	111	EV4	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.250	0.10	-	-	-	-
	112	EV5	+	Rods	1.0x1.5-2.5	Not detedted			-	-	-
	113	EV12	+	Rods	1.0x1.2-1.5	0.662	0.45	-	-	-	-
	114	AH3	+	Cocci	1.0x1.0	0.131	0.34	6.53	-	+	-
	115	AH5	+	Cocci/Oval	0.8-1.0x1.0-2.0	0.164	0.30	-	-	+	-
	116	EH3	+	Rods	1.0x1.2-2.0	0.141	0.135	-	-	-	-
	117	EH4	+	Cocci	0.5x0.5	0.147	0.475	6.56	-	-	-
	118	EH7	+	Rods	0.8x1.0-2.0	0.093	0.28	-	-	+	-

Fish sauce fermentation time (week)	No.	Isolate	Gram stain	Cell shape	Cell dimension (μm)	Histamine production test			Enzyme production test		
						Histamine (ppm)	Growth (A600)	pH of medium	Caseinase	Lipase	Amylase
37 (19 ก.พ. 2546) วิเคราะห์ตัวอย่าง	119	AMN42	+	Cocci	1.0x1.0	0.259	0.90	5.62	-	-	-
	120	AM24	+	Rods	0.8x2.0-4.0	0.190	0.04	5.60	-	-	-
	121	AM25	-	Rods	0.5x1.0-1.5	0.197	0.07	5.63	-	-	-
	122	AM26	+	Cocci	1.0x1.0	No growth			-	-	-
	123	CMN2	+	Rods	0.9-1.0x1.5-3.0	0.250	0.28	5.60	-	-	-
	124	CM1	+	Cocci	1.0x1.0	0.219	0.90	5.53	+	-	+

หมายเหตุ จำนวนไอโซเลทที่เลือกมาศึกษาขึ้นกับสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ที่แตกต่างกันในขั้นตอนการแยกและคัดเลือกเชื้อด้วย Selective media

1. ชื่อ : (ภาษาไทย) นายจิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirawat Yongsawatdigul

2. ประวัติการทำงาน

สิงหาคม - ปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สาขาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พฤษภาคม 2540 – กรกฎาคม 2542
อาจารย์
สาขาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มกราคม 2539 - เมษายน. 2540
นักวิจัย (Research Associate)
Oregon State University Seafood Laboratory
Astoria, OR. 97103. USA.

3. ประวัติการศึกษา

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

4. รางวัลจากงานวิจัย

1995 Recipient of Research Associate Assistance Award from The American Institute of Fishery Research Biologists. USA.

1994 Recipient of Walter G. Jones Fisheries Development Memorial Award. Recognition of an outstanding graduate student who conducts research work contributing to fisheries development. Oregon State University, USA.

1994 Recipient of Graduate Paper Competition Award from Seafood Technology Division. Institute of Food Technologists. USA.

1988 Recipient of Outstanding Food Science Student from The Food Technologists Association of Thailand.

Member:

-Institute of Food Technologists, USA

-Gamma Sigma Delta The Honor Society of Agriculture, USA

5. งานวิจัยและแหล่งทุนที่ได้รับการสนับสนุน

1. **ชื่อโครงการ** ปัจจัยที่มีผลต่อฮีสตามีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา
   แหล่งทุน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   ระยะเวลา 2.5 ปี (2542-2544)
2. **ชื่อโครงการ โปรตีเนสและทรานกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ**
   แหล่งทุน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   ระยะเวลา 2 ปี (2543-2544)
3. **ชื่อโครงการ การลดปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลา**
   แหล่งทุน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   ระยะเวลา 2 ปี (2544-2545)
4. **ชื่อโครงการ ผลกระทบของคุณภาพความสดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดั้งเดิมของมัยโอซินต่อความสามารถในการเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อจากปลาทรายแดง**
   แหล่งทุน สกว
   ระยะเวลา 2 ปี (2542-2543)
   งบประมาณ 400,000 (ตลอดโครงการ)
   หน้าที่รับผิดชอบ หัวหน้าโครงการ

5. **ชื่อโครงการ** การทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของทรานกลูทามิเนสจากปลานิล
แหล่งทุน ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ
ระยะเวลา 2 ปี (2544-2545)
งบประมาณ 488,000 (ตลอดโครงการ)
หน้าที่รับผิดชอบ หัวหน้าโครงการ

6. **ชื่อโครงการ** การเร่งกระบวนการแปรรูปน้ำปลา
แหล่งทุน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านทาง มทส.
ระยะเวลา 1 ปี (2543)
งบประมาณ 180,000 (ตลอดโครงการ)
หน้าที่รับผิดชอบ ผู้ร่วมโครงการ

7. **ชื่อโครงการ** การเชื่อมโยงโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดงด้วยพันธะโควาเลนท์
โดยทรานสกลูทามิเนส
แหล่งทุน สกว
ระยะเวลา 3 ปี (2544-2546)
งบประมาณ 1,080,000 (ตลอดโครงการ)
หน้าที่รับผิดชอบ หัวหน้าโครงการ

8. **ชื่อโครงการ** การพัฒนากระบวนการผลิตลูกชิ้นและไส้กรอกจากปลาน้ำจืด
แหล่งทุน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
ระยะเวลา 2 ปี (2545-2546)
งบประมาณ 732,000บาท

9. **ชื่อโครงการ** Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi.
แหล่งทุน International Foundation for Science (IFS), Sweden
ระยะเวลา 2 ปี (2545-2546)
งบประมาณ US$ 11,700

6. ผลงานที่ตีพิมพ์

Research articles

1. Park, J.W., **Yongsawatdigul, J.**, and Lin, T.M. 1994. Rheological behavior and potential cross-linking of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 59: 773-776.
2. **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., Kolbe, E., AbuDagga, Y., and Morrissey, M.T. 1995. Ohmic heating maximizes gel functionality of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 60: 10-14.
3. **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., and Kolbe, E. 1995. Electrical conductivity of Pacific whiting surimi during ohmic heating. J. Food Sci. 60: 922-925, 935.
4. **Yongsawatdigul, J.** and Park, J.W. 1996. Linear heating rate affects gel formation of Alaska pollock and Pacific whiting. J. Food Sci. 61: 432-438.
5. ***Yongsawatdigul, J.***, *Park, J.W., and Kolbe, E. 1997. Degradation kinetics of myosin heavy* chain of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 62: 724-728.
6. Park, J.W., Lin, T.M., and **Yongsawatdigul, J.** 1997. New developments in manufacturing of surimi and surimi seafood. Food Rev. Int. 13(4): 577-610.
7. **Yongsawatdigul, J.** and Park, J.W. 1999. Thermal aggregation and dynamic rheological properties of Pacific whiting and cod myosin as affected by heating rate. J. Food Sci. 64: 679-683.
8. **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., Virulhakul, P., and Viratchakul, S. 2000. Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. J. Food Sci. 65: 129-133.
9. Klesk, K., **Yongsawatidigul, J.**, Park, J.W., Viratchakul, S., and Virulhakul, P. 2000. Physical behavior of tilapia (*Oreochromis niloticus*) surimi gels at various thermal treatments as compared with Alaska pollock and Pacific whiting surimi. J. Aquat. Food Prod. 9: 91-104.
10. **Yongsawatdigul, J.** and Park, J.W. 2002. Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice. J. Food Sci. 67(3): 985-990.
11. **Yongsawatdigul, J.**, Worratao, A., and Park, J. 2002. Effect of endogenous transglutaminase on gelation of threadfin bream surimi. J. Food Sci. 67(9): 3258-3263.
12. Worratao, A and **Yongsawatdigul, J.** 2003. Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. Food Biochem. 27: 35-51.

13. **Yongsawatdigul, J.** and Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. Food Chem. In press.

Book chapters

1. Park, J.W., **Yongsawatdigul, J.**, and Kolbe, E. 1998. Proteolysis and gelation of fish proteins under ohmic heating. In *Process-Induced Chemical Changes in Foods*, (Eds.), F. Shahidi, C.T. Ho, and V.C. Nguyen. Plenum Publishing Corp, New York. pp25-34.
2. Park. J.W. and **Yongsawatdigul, J.** 1999. Gelation properties of fish proteins under ohmic heating. In *Quality Attributes of Muscle Foods*, (Eds.), Xiong et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 421-429.
3. **Yongsawatdigul, J.** 1998. Ohmic heating of surimi seafood. In *Advanced Technology in Surimi Seafood Manufacturing Workshop Manual.* August 18-20, 1998. Bangkok Thailand.