รหัสโครงการ 3-305-44-12-17

รายงานการวิจัย

การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาปลาทะตักและในเนื้อปลาสร้อย

Formation of Biogenic Amines in Anchovy Fish Sauce and in Jullien's Mud Carp

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาจุลชีววิทยา

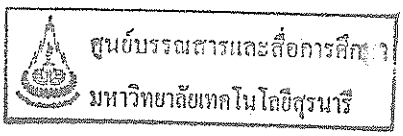
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 - พ.ศ. 2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2548



กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544-2545 ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณสุชาดา อุทุมพร คุณศิริวรรณ ณะวงษ์ ที่ทำงานอย่างอดทน มุมานะ จนทำให้โครงการสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณ คุณเพ็ญประภา ปียธรรมวิบูลย์และคุณนัทธีวรรณ อุดมศิลป์ ที่ช่วยจัดรูปเล่มของรายงาน ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยจัดทำเอกสารการเบิกจ่ายและจัดทำบัญชีเป็นที่เรียบร้อย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ฮีสตามีน คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน เป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบในปลากะตัก (*Stolephorus indicus*) ที่เน่าเสียโดยการบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 และ 16 ชั่วโมง ในปริมาณสูง และพบในน้ำปลาที่หมักจากวัตถุดิบดังกล่าวด้วย ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดระยะเวลาการหมักที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ ซึ่งบ่งชี้ว่าการปนเปื้อนของไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลามาจากปลาซึ่งเป็นวัตถุดิบมากกว่าที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ของตัวอย่างที่หมักจากปลาที่เน่าเสียมีค่าสูงกว่าที่หมักจากปลาสดในระยะแรกของการหมักทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ และ ปริมาณเปไทด์เริ่มมีค่าใกล้เคียงกันในช่วงสุดท้ายของการหมัก ดังนั้นวัตถุดิบปลาที่เน่าเสียไม่มีผลต่อการลดระยะเวลาในกระบวนการหมัก ไบโอจีนิกเอมีนสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลาร่วมกับปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด

Morganella morganii, Enterobacter aerogenes, Proteus vulgaris และ *Staphylococcus xylosus* สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้สูงในปลากะตักและอาหารเหลว เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ศึกษา *Enterobacter aerogenes* สามารถสร้างคาดาเวอรีนได้สูงที่ 0, 15 และ 35°ซ ในขณะที่ *Morganella morganii* เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวที่สามารถสร้างพิวเทรสซีนในอาหารเหลวที่ 15°ซ และทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสร้างพิวเทรสซีนได้สูงในอาหารเหลวที่ 35°ซ แต่ *Enterobacter aerogenes* และ *Proteus vulgaris* สร้างพิวเทรสซีนในปลากะตักได้สูงสุดที่ 15 และ 35°ซ ตามลำดับ ทั้ง 4 สายพันธุ์สร้างไทรามีนได้น้อยในอาหารเหลว แต่ *Enterobacter aerogenes* และ *Staphylococcus xylosus* สร้างไทรามีนได้สูงที่ 15 และ 35°ซ เมื่อทดสอบในปลากะตัก ทุกสายพันธ์สร้างสเปอมีนและสเปอมิดีนได้น้อยเมื่อทดสอบในอาหารเหลวและในปลากะตักที่ทุกอุณหภูมิที่ศึกษา

จากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่เน่าเสียซึ่งบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA), violet red bile glucose agar (VRBG), thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS), pseudomonas isolation (PI) สามารถแยกและคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 495 ไอโซเลท โดย 136 ไอโซเลทนั้นสามารถสร้างฮีสตามีนในอาหารเหลว Histamine evaluation broth (HEB) มากกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 35°ซ ภายใน 18 ชั่วโมง และพบว่าแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนแยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในสัดส่วนสูงคือ 53.4% และที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI ในสัดส่วนต่ำสุดคือ 5.3% *Plesiomonas shigelloides* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่คัดแยกได้จากปลาสร้อยสดและที่เน่าเสีย และสามารถสร้างฮีสตามีนได้ระหว่าง 14.4-191.3 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร นอกจากนี้ แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงที่พบคือ *Morganella morganii,*

Klebsiella oxytoca, Aeromonas hydrophila และ *Serratia fonticula* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนได้ตั้งแต่ 0.49 – 464.1 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร และเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว MØller ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว พบว่า *Plesiomonas shigelloides* และ *Serratia fonticula* สามารถสร้างคาดาเวอรีน และพิวเทรสซีนได้สูง *Klebsiella oxytoca* และ *Aeromonas hydrophila* สามารถสร้างคาดาเวอรีนได้สูง ในขณะที่ *Morganella morganii* ผลิตพิวเทรสซีนได้สูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Histamine, cadaverine, putrescine, and tyramine were predominant biogenic amines found in anchovy left at 35°C for 16 h and its fish sauce product. Changes of biogenic amines were subtle during the course of fermentation at room temperature (RT) and at 40°C, suggesting that the main source of biogenic amines was associated with raw material, rather than with fermentation process. Soluble peptide of fish sauce prepared from temperature-abused anchovy were higher at the initial stage of fermentation at RT and 40°C and became comparable to those prepared from fresh anchovy at the end of fermentation. Biogenic amines should be considered along with total nitrogen content as quality indicators of fish sauce.

Morganella morganii, Enterobacter aerogenes, Proteus vulgaris, and *Staphylococcus xylosus* were able to produce biogenic amines in anchovy and in the culture broth. Among 4 bacteria studied, *Enterobacter aerogenes* produced the highest level of cadaverine at 0, 15, and 35°C. The highest putrescine level in the broth incubated at 15°C was found in the presence of *Morganella morganii*, while all four bacteria produced high level of putrescine at 35°C. However, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus vulgaris* produced the highest putrescine in anchovy stored at 15 and 35°C, respectively. All 4 bacteria produced insignificant amount of tyramine in the broth, but *Enterobacter aerogenes* and *Staphylococcus xylosus* appeared to produce tyramine in anchovy stored at 15 and 35°C. Spermine and spermidine were insignificantly produced by all studied bacteria.

Histamine-forming bacteria were isolated from fresh Jullien's mud carp (*Cirrhina jullieni)* and those incubated at 35°C for 20 h to induce spoilage, using plate count agar (PCA), violet red bile glucose agar (VRBG), thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS), pseudomonas isolation (PI). The total of four hundreds and ninety five isolates were obtained, and 136 isolates of those produced histamine >0.5 mg/100 ml in HEB incubated at 35°C for 18 h. Approximately 53.4% of isolates obtained from PCA was histamine formers, while only 5.3% of isolates obtained from PI was considered as histamine formers. *Plesiomonas shigelloides* was the predominant species found in fresh and spoiled Jullien's mud carp, and produced histamine ranging from 14.4 to 101.3 mg/100 ml. Other histamine formers including *Morganella morganii, Klebsiella oxytoca, Aeromonas hydrophila* and *Serratia fonticula* were also isolated and identified. *Plesiomonas shigelloides* and *Serratia fonticula* were able to produce cadaverine and putrescine at high level in the broth. *Klebsiella oxytoca* and

Aeromonas hydrophila also produced high level of cadaverine whereas *Morganella morganii* produced high level of putrescine in the broth.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
ขอบเขตการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์	6
วิธีดำเนินการวิจัย	
วัสดุและสารเคมี	7
การทดลองที่ 1 คุณภาพความสดต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา	7
การทดลองที่ 2 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยแบคทีเรียที่คัดแยกจากปลากะตัก	10
การทดลองที่ 3 การแยกและระบุชนิดจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลาสร้อย	11
ผลการวิจัย	
1. การเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา	
- ผลของคุณภาพความสดต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีน	14
- การเปลี่ยนแปลงของแอลฟาอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมัก	21
2. การสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยแบคทีเรียที่แยกจากปลากะตัก	
- การสร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก	23
- ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว	34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3. การแยกและระบุชนิดจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลาสร้อย
- คุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่เริ่มเน่าเสีย 38
- การแยกคัดเลือกและระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนในปลาสร้อย 39
- ความสามารถในการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 47

สรุป 50

เอกสารอ้างอิง 51

ประวัตินักวิจัย 55

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก	3
ตารางที่ 2 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนและดัชนีคุณภาพความสดทางเคมีอื่นๆ ในปลากะตักเก็บที่ 35°ซ เป็นระยะเวลาต่างๆ	15
ตารางที่ 3 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน ไนโตรเจนทั้งหมด และแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาทางการค้า	20
ตารางที่ 4 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว MØller ที่ 15°ซ ของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่แยกจากปลากะตักที่เน่าเสีย	35
ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว MØller ที่ 35°ซ ของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่แยกจากปลากะตักที่เน่าเสีย	36
ตารางที่ 6 คุณภาพทางเคมีของปลาสร้อยที่สภาวะความสดต่างๆ	38
ตารางที่ 7 จำนวนไอโซเลทที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากตัวอย่างปลาสดและปลาที่เน่าเสีย	40
ตารางที่ 8 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาสร้อย	46
ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของไบโอจีนิกเอมีนที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกจากปลาสร้อยที่เน่าเสีย	48

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ปลากะตักสด (a) ปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 8 ชั่วโมง (b) และปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 16 ชั่วโมง (c) Put, putrescine; Tpm, tryptamine; Spm, spermine; Cad, cadaverine; Him,histamine; Tym, tyramine; Spd, spermidine. 16

รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่ 40°ซ โดยใช้ปลากะตักสด (a) ปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 8 ชั่วโมง (b) และปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 16 ชั่วโมง (c) 17

รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟาอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง) a) และที่ 40°ซ (b) F=ปลาสด, 8h และ 16h=บ่มปลาที่ 35°C เป็นเวลา 8 และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ 22

รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ของตัวอย่างปลากะตักที่ inoculate ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ และเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) 24

รูปที่ 5 การสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 25

รูปที่ 6 การสร้างคาดาเวอรีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโตนและ เก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 27

รูปที่ 7 การสร้างพิวเทรสซีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโตนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 28

รูปที่ 8 การสร้างทริพทามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 29

รูปที่ 9 การสร้างไทรามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 30

รูปที่ 10 การสร้างสเปอมีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 32

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 การสร้างสเปอมิดีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ 33

รูปที่ 12 จำนวนจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่เน่าเสีย 39
Fl(F) = Fresh flesh (เนื้อปลาสด) , I(F) = Fresh intestine (ไส้จากปลาสด),
Fl(S) = Spoiled flesh (เนื้อปลาที่เน่าเสีย), I(S) = Spoiled intestine
(ไส้จากปลาที่เน่าเสีย)

รูปที่ 13 ผลบวกจากการทดสอบโดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven และ Histamine evaluation broth (HEB) ของไอโซเลทที่คัดแยกได้จากปลาสร้อยสด (a) และปลาสร้อยที่เน่าเสีย (b) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่างๆ 41

รูปที่ 14 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนใน HEB ของไอโซเลทที่แยกได้จากอาหาร PCA 43

รูปที่ 15 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนใน HEB ของไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ 43

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines) คือสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน โดยเอนไซม์ อะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (amino decarboxylase) ไบโอจีนิกเอมีนที่พบโดยทั่วไปได้แก่ ฮีสตามีน (histamine) ไทรามีน (tyramine) คาดาเวอรีน (cadaverine) เป็นต้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน (histidine) ไทโรซีน (tyrosine) และ ไลซีน (lysine) ตามลำดับ ไบโอจินิกเอมีนเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา (Malle et al., 1996) และอาหารหมักดอง (Maijala et al., 1995) ดังแสดงในตารางที่ 1 การปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารสามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในผู้บริโภค อาการเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมงหลังการบริโภค โดยมีอาการแพ้เป็นผื่นที่คอและหน้า เหงื่อออกมาก ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง (Taylor, 1986) มีรายงานการเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากฮีสตามีนในประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และ สหราชอาณาจักร

ปริมาณฮีสตามีนต่ำ (น้อยกว่า 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ถือเป็นสิ่งปกติที่พบได้ในอาหาร ส่วนปริมาณฮีสตามีนที่สูงกว่า 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะทำให้ผู้บริโภคมีอาการอาหารเป็นพิษรุนแรงได้ ฮีสตามีนเป็นสารที่ทนความร้อนสูง ความร้อนที่ใช้ในกระบวนผลิตอาหารไม่สามารถทำลายฮีสตามีนได้ (Gibson, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าไบโอจีนิกเอมีนบางชนิดเช่น พิวเทรสซีน (putrescine) และคาดาเวอรีนมีผลเสริมความรุนแรงของฮีสตามีนโดยไบโอจีนิกเอมีน 2 ชนิดนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ diamine oxidase และ histamine N-methyltransferase (Stratton et al., 1991) ซึ่งทั้ง 2 เอนไซม์นี้มีบทบาทในการลดความเป็นพิษของฮีสตามีนเมื่อเข้าสู่ร่างกาย โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้จะอยู่ในระบบทางเดินอาหารช่วยป้องกันการดูดซึมของฮีสตามีนเข้าสู่ระบบหมุนเวียนของร่างกาย ดังนั้นการยับยั้งปฏิกิริยาของ diamine oxidase และ histamine N-methyltransferase จึงส่งผลให้เกิดการดูดซึมฮีสตามีนเข้าสู่ร่างกาย

น้ำปลาเป็นอาหารหมักดองที่บริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศไทย และส่งออกนำรายได้เข้าประเทศโดยมีมูลค่าส่งออกทั้งสิ้นในปี 2546 ประมาณ 833 ล้านบาท (www.customs.go.th) ปลาที่นิยมนำมาทำน้ำปลา คือ ปลากระตัก (*Stolephorus* spp.) (ไพโรจน์, 2533) ปราณีและคณะ (2538) พบว่า ปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลาที่ผลิตในประเทศไทย 26 ตัวอย่างอยู่ระหว่าง 3.6-103.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยน้ำปลา 14 ตัวอย่างมีปริมาณฮีสตามีนเกิน 20 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดโดยประเทศต่างๆ เช่น ในประเทศแคนาดาได้กำหนดปริมาณสูงสุดของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลา

กระป๋อง และผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักดองสำหรับนำเข้าเป็น 10 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (NIPC, 1993) ปริมาณฮีสตามีนที่สูงในน้ำปลานั้นอาจไม่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษแก่ผู้บริโภค เนื่องจากปริมาณการบริโภคค่อนข้างน้อยคือโดยเฉลี่ย 23.5 กรัมต่อคนต่อวัน (อมรา, 2533) หากแต่ปริมาณสูงเกินค่ามาตรฐานนั้นไม่เป็นที่ยอมรับแก่ผู้ซื้อในประเทศต่างๆ ซึ่งจะส่งผลกระทบให้การขยายตัวของน้ำปลาในตลาดโลกเป็นไปอย่างลำบาก อันจะทำให้รายได้ของประเทศในส่วนนี้ลดลง นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารต่อเนื่องอื่นๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ผักดอง ซอสปรุงรสสำเร็จอื่น ๆ เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาที่มีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีนที่ต่ำเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมาตรฐานคุณภาพชีวิตของคนไทยซึ่งบริโภคน้ำปลาเป็นประจำแล้ว ยังเป็นการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของน้ำปลาในตลาดโลกอีกด้วย

ปลากะตัก (*Stolephorous* spp.) เป็นวัตถุหลักในการผลิตน้ำปลาของประเทศไทย ซึ่งมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนด้วยฮีสตามีน Rodtong et al. (2005) พบว่า ฮีสตามีนในปลากะตักมีปริมาณสูงถึง 130 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อเก็บไว้ที่ 35°ซ เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณฮีสตามีนของปลากะตักเก็บที่ 0°ซ เป็นเวลา 15 วัน คือ 2 มิลลิกรัม/100 กรัม และพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างฮีสตามีนในปลากะตัก ส่วนจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการสร้างฮีสตามีนในปลาซาร์ดีน ปลาทูน่าได้แก่ *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) Rodriguez-Jerez et al. (1994a) รายงานว่า *Morganella morganii* ที่แยกได้จาก Semipreserved Spanish anchovies *(Engraulis encrasicholus)* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดคือ 233.7±35.6 มิลลิกรัม/100 กรัม ที่ 37°ซ นอกจากนี้ยังพบว่า *Morganella morganii* และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สร้างฮีสตามีน สามารถสร้างพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนได้อีกด้วย

Veciana-Nogues et al. (1996) พบว่า การเน่าเสียของปลากะตัก *(Engraulis encrasicholus)* ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน นอกจากนี้การเน่าเสียของปลา gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) ที่อุณหภูมิการเก็บ 0-15°ซ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีน Rossi et al. (2002) พบการสะสมของคาดาเวอรีนในปลาทูน่า skipjack เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและในน้ำแข็ง ในขณะที่อัตราการเพิ่มขึ้นของพิวเทรสซีนเกิดต่ำกว่า จึงได้แนะนำการใช้ปริมาณคาดาเวอรีนร่วมกับฮีสตามีนในการติดตามการเน่าเสียของปลาทูน่าชนิดนี้ จะเห็นได้ว่าการเน่าเสียของปลาไม่ได้ทำให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนเท่านั้น แต่ยังทำให้เกิดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นด้วย ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของปลาและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย อย่างไรก็

ตาม ยังไม่มีรายงานการเกิดไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก จิรวัฒน์ และคณะ (2546) รายงานว่าคุณภาพความสดของวัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณฮีสตามีนในน้ำปลา การเปลี่ยนแปลงฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักเกิดขึ้นน้อยมาก แต่ก็ยังไม่มีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในวัตถุดิบปลากะตักและระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

ตารางที่ 1 ปริมาณเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก[1]

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 ปริมาณเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก[1] (ต่อ)

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

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

[2] Non detected

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นอกจากการผลิตน้ำปลาจากปลากะตักแล้ว ยังมีการผลิตน้ำปลาจากปลาน้ำจืด เช่น ปลาสร้อย (*Cirrhina* spp) แม้จะมีปริมาณผลิตไม่สูงนักเมื่อเทียบกับปลากะตัก แต่มีการส่งเสริมจากหน่วยงานของรัฐในรูปแบบของหนึ่งผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบล อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพความสดของปลาสร้อย นอกจากนี้ปลาสร้อยยังเป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตน้ำปลา เนื่องจากสามารถควบคุมคุณภาพความสดได้ดีกว่าปลากะตัก โดยเฉพาะกระบวนการเก็บรักษาหลังการจับที่ง่ายกว่าปลาทะเล

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา
2. ศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากะตักและสร้างฮีสตามีนได้สูง
3. คัดแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในปลาสร้อย และทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำปลาจากปลากะตัก นอกจากนี้ศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนที่คัดแยกได้จากปลากะตัก จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (จิรวัฒน์ และคณะ 2546) และคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนจากปลาสร้อย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับการเกิดไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลา ซึ่งจะนำไปสู่วิธีการควบคุมปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในกระบวนการผลิตน้ำปลาอย่างมีประสิทธิภาพ และจะนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตน้ำปลาที่มีปริมาณไบโอจินิกเอมีนต่ำอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานอันเป็นที่ยอมรับแก่ประเทศคู่ค้า และสามารถแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตรายอื่นได้ในเชิงคุณภาพ นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากปลาน้ำจืดให้กว้างขวาง ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับอุตสาหกรรมน้ำปลาซึ่งกำลังประสบปัญหาวัตถุดิบปลากะตักที่มีปริมาณลดลง และมีปัญหาในการประมงค่อนข้างสูง

หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ อุตสาหกรรมน้ำปลา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุข กลุ่มผู้ผลิตหนึ่งผลิตภัณฑ์ หนึ่งตำบลประเภทน้ำปลาและผลิตภัณฑ์หมักดองจากปลาสร้อย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

ตัวอย่างปลากะตัก (*Stolephorus* sp.) จากสะพานปลาช่องแสมสาร จังหวัดชลบุรีโดยเก็บปลาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งหลังจากจับทันที นำเข้าฝั่งภายใน 6 ชั่วโมงหลังการจับ จากนั้นเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ทันที ปลาสร้อย (*Cirrhina* spp.) ซื้อจากเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในเขตอำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครราชสีมา ตัวอย่างน้ำปลาทางการค้า เป็นน้ำปลาคุณภาพต่างๆ ที่วางขายในห้างสรรพสินค้า และบางตัวอย่างเก็บจากโรงงานน้ำปลาในเขตจังหวัดระยอง

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

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 คุณภาพความสดต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำปลา

ศึกษาผลของคุณภาพความสดต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา โดยแปรระดับความสดของปลากะตักดังนี้ (1) ปลาสด (F) โดยนำมาคลุกเคล้าเกลือสมุทรทันทีเมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการในอัตราส่วนปลาต่อเกลือ 7 ต่อ 3 (2) บ่มตัวอย่างปลาที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (8h) ก่อนนำมาคลุกเคล้าเกลือ และ (3) บ่มตัวอย่างปลาที่ 35°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (16h) ก่อนนำมาคลุกเคล้าเกลือ วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน ปริมาณ trimethylamine ค่า total volatile basic nitrogen (TVB-N) และ ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ (soluble oligopeptides)

เตรียมตัวอย่างปลาหมักข้างต้น (5 กิโลกรัม) บรรจุในขวดโหลแก้วขนาดบรรจุ 6 ลิตร ขวดโหลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 17 เซนติเมตร สูง 27 เซนติเมตร ปริมาตรตัวอย่างคิดเป็น 90% ของ

ปริมาตรขวดโหล ปิดขวดโหลด้วยแผ่นกระจก หมักตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง (25-32°ซ) เป็นเวลา 52 สัปดาห์ เตรียมตัวอย่างอีก 1 ชุดดังกล่าวข้างต้นและบ่มที่ 40°ซ ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Hotpack an SP Industries Co., Philadelphia, PA) เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีน และปริมาณ α-amino ในแต่ละช่วงเวลาระหว่างการหมัก

1.2 การวิเคราะห์ไบโอจีนิกเอมีน

วิเคราะห์ปริมาณ ฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน พิวเทรสซีน สเปอมิดีน และ สเปอมีน ในตัวอย่างปลากะตักและน้ำปลาด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (HP 1100, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Calif, USA) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Eerola et al. (1993) สกัดสารไบโอจีนิกจากตัวอย่างปลากะตักโดยบดผสมปลากะตัก 5 กรัมในสารละลาย perchloric เข้มข้น 0.4 โมลลาร์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) จากนั้นนำไปสกัดต่อ ปั่นเหวี่ยง และกรองอีกครั้ง เติมสารละลาย 1,7-diaminoheptane เข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็น internal standard ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างน้ำปลานั้นเจือจางด้วยสารละลาย perchloric เข้มข้น 0.4 โมลลาร์ 2 หรือ 200 เท่า ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไบโอจีนิกเอมีน จากนั้นเติมสารละลาย internal standard เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัม/ลิตร

นำสารที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายอิ่มตัวโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย dansyl chloride เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน acetone ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 45°ซ นาน 45 นาที กำจัด dansyl อิสระโดยเติมแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดวัดปริมาตรด้วย acetonitrile กรองสารละลายผ่านแผ่นกรอง 0.45 ไมครอน (Agilent Technologies, Inc., Germany) ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC ซึ่งใช้ diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรโดยใช้ความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ไบโอจีนิกเอมีนด้วยคอลัมน์ Hypersil BDS C18 (100×4 mm I.D., 3μm, 100 Å) และ Hypersil BDS C18 (4×4 mm I.D., 5μm, 100 Å) guard column โดย mobile phase ที่ใช้คือสารละลาย ammonium acetate (solvent A) เข้มข้น 0.1 โมลลาร์ และ acetonitrile (solvent B) ที่อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตร/นาที เริ่มต้นใช้ isocratic elution ด้วย solvent B 50% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็น gradient elution โดยเพิ่มสัดส่วนของ solvent B เป็น 90%

ภายใน 25 นาที จากนั้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยตัวทำละลาย A และ B อย่างละ 50% เป็นเวลา 23 นาที ก่อนการฉีดตัวอย่างครั้งต่อไป ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40°ซ ปริมาตรของการฉีดตัวอย่างคือ 10 ไมโครลิตร

1.3 ปริมาณ Trimethylamine (TMA) และ total volatile base-nitrogen (TVB-N)

วิเคราะห์ปริมาณ trimethylamine (TMA) ของวัตถุดิบตามวิธีของ Dyer Picrate method (AOAC, 1995) โดยบดผสมตัวอย่าง 20 กรัม ในสารละลาย trichloroacetic acid เข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm (PK 121R, ALC International Srl) ที่ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปสกัดต่อด้วย toluene และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย picric acid เข้มข้น 1% วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยใช้ trimethylamine เป็นสารมาตรฐาน คำนวณค่า TMA ในหน่วย mg-TMA/100g.

วิเคราะห์ปริมาณ total volatile base-nitrogen (TVB-N) ของวัตถุดิบโดยหลักการกลั่นตามวิธีของ Botta et al. (1984) บดผสมตัวอย่าง 10 กรัมในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติม MgO 2 กรัม นำตัวอย่างของผสมไปกลั่น (Vapordest 30, Gerhardt, Germany) เป็นเวลา 5 นาที ไทเทรตสารที่กลั่นได้ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล คำนวณค่า TVB-N ในหน่วย mg-N/100g ตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์

วิเคราะห์ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโนที่ละลายได้ตามวิธีของ Field (1972) ผสมน้ำปลาที่กรองแล้วกับสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้น 1% (w/v)ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้ความเข้มข้นไม่เกินสารละลายมาตรฐาน leucine เข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2125 โมลลาร์ (pH 8.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย trinitrobenzesulfonic (TNBS) เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 50°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรด HCl เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกรดอะมิโนในรูปหมู่แอลฟาอะมิโนที่ละลายได้ โดยเทียบกับสารละลายกรดอะมิโนลูซีน (leucine)

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดตามวิธี AOAC (1995) โดยใช้ตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร และเครื่องย่อย Kjeldhtherm (Gerhardt, Germany) และเครื่องกลั่น Vapordest 30 (Gerhardt, Germany)

การทดลองที่ 2 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยแบคทีเรียที่แยกจากปลากะตัก

วัตถุประสงค์ในชุดการทดลองนี้คือศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ *Morganella morganii, Enterobacter aerogenes, Staphylococus xylosus* และ *Proteus vulgaris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากะตักเน่าเสียและเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูง (จิรวัฒน์และคณะ 2546)

2.1 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกในปลากะตัก

นำปลากะตักแช่เยือกแข็งที่ -20°ซ มาทำการฆ่าเชื้อด้วยสารผสม ethanol/acetone ตามวิธีของ López-Sabater et al. (1996) โดยล้างเนื้อปลา 100 กรัม ด้วยสารผสมเอทธานอล-อะซีโทน (ethanol-acetone, 1:1) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนผสมตัวอย่างปลาเป็นเวลา 1.5 นาที เทสารละลายอินทรีย์ออก จากนั้นล้างตัวอย่างปลาด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 4-5 ครั้ง

เตรียมเชื้อ *Morganella morganii* , *Enterobacter aerogenes, Staphylococus xylosus* และ *Proteus vulgaris* เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีน โดย streak บน tryptic soy agar (TSA) บ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colony) 1 โคโลนี ใส่ลงใน tryptic soy broth และบ่มที่ 35 °ซ 18-20 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางปริมาณเชื้อให้ได้ 10^8 cfu/ml (เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Mcfarland No. 2) ปีเปตเชื้อที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในตัวอย่างปลากะตักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทธานอล-อะซีโทน 100 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 19 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher (Stomacher 400, Seward, England) เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จากนั้นแบ่งของผสมใส่ขวดฝาเกลียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขวดละ10 กรัม นำไปบ่มที่ 0, 15 และ 35°ซ สุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดในแต่ละช่วงระยะเวลาต่างๆ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) ซึ่งบ่มที่ 35 °ซ เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นอกจากนี้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนด้วย HPLC ตามรายละเอียดข้างต้น

2.2 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อที่คัดเลือกในอาหารเหลว

เตรียมเชื้อ *Morganella morganii* , *Enterobacter aerogenes, Staphylococus xylosus* และ *Proteus vulgaris* อายุ 20-24 ชั่วโมง บน tryptic soy agar (TSA) จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colony) 1 โคโลนี ใส่ลงใน MØller ซึ่งเติม 0.4% L-lysine, L-histidine, L-ornithine และ L-tyrosine โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rodriguez-Jerez et al. (1994a) และบ่มให้แบคทีเรียเจริญในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นเวลา 5 วัน และที่ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกที่ 13,000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendorf , Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไบโอจินิกเอมีนโดยใช้เครื่อง HPLC (Hewlett-Packard HP 1100, Agilent Technologies, USA) ตามรายละเอียดข้างต้น

การทดลองที่ 3 การแยกและระบุชนิดจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลาสร้อย

3.1 ตัวอย่างปลาสร้อย

เก็บตัวอย่างปลาสร้อยสด (*Cirrhina jullieni*) จากอำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครราชสีมา โดยบรรจุในกล่องโฟมน้ำแข็ง ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ภายในเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ แบ่งตัวอย่างปลาเพื่อทดลองเป็นชุดตัวอย่างปลาสดและชุดที่นำปลาสดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

3.2 การตรวจวัดคุณภาพทางเคมีของปลาสร้อยที่มีความสดและที่เริ่มเน่าเสีย

ตรวจวัดคุณภาพทางเคมีของปลาสร้อยและปลาที่บ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยบดตัวอย่างพร้อมไส้ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณฮิสตามีน, pH , total volatile base-nitrogen (TVB-N) และ trimethylamine (TMA) ตามรายละเอียด 1.3

3.3 การแยกและตรวจนับแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนในปลาสร้อย

แยกและตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างปลาทั้งจากปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่บ่มจนเกิดการเน่าเสียที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยแยกวิเคราะห์ส่วนเนื้อ และส่วนของไส้ ตามวิธีนับมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา (AOAC International, 1998) โดยชั่งตัวอย่างปลา 25 กรัม ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันในสารละลายเปปโทนเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Stomacher (Stomacher 400 Lab Blender, Seward, London, England) เจือจางในสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ (pH 7.0) ปลอดเชื้อ ด้วยวิธี Serial dilution และเกลี่ย suspension ของเชื้อบนผิวหน้าอาหารวุ้นด้วย Spread plate technique ตามวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา ทำการทดลองสองซ้ำ ซึ่งอาหารวุ้นที่ใช้เป็น Selective media คือ Violet red bile glucose agar (VRBG), Thiosulfate Citrate bile salt agar (TCBS) , Pseudomonas isolation (PI), และ Niven (ที่เติม 2.7% Histidine-HCl) และใช้ Plate count agar (PCA) เพื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และบ่มให้จุลินทรีย์เจริญบนอาหารทุกชนิดที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อที่เจริญแบบสุ่มและที่มีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้ TSA agar สำหรับแบคทีเรียที่เลือกเก็บโคโลนีจากที่เจริญบนอาหาร VRBG, TCBS, PI, PCA และ Niven โดยบ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 35°ซ เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้โดยใช้อาหาร Tryptic soy agar (TSA) และ MRS ตามลำดับ

3.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกจากปลาสร้อย

ทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรียที่เลือกเก็บโดยใช้อาหาร Niven agar และบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกคือเกิดวงแหวนสีม่วงรอบโคโลนีซึ่งแสดงถึงความสามารถในการสร้างฮิสตามีนในขั้นต้น จากนั้นจึงนำแบคทีเรียไอโซเลทไปทดสอบการสร้างฮิสตามีนโดยใช้อาหารเหลว Histamine evaluation broth (HEB) ซึ่งประกอบด้วย 0.5% tryptone, 0.5%NaCl, 0.25%K_2HPO_4 และ 1% Histidine-HCl โดยเตรียมเชื้ออายุ 20-24 ชั่วโมง ที่เจริญบน TSA agar และใส่เชื้อ 1 Loopful ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ HEB 5 มิลลิลิตร บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendorf , Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนโดยวิธี Spectrofluorometric (AOAC, 1995) คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ในอาหารเหลวในปริมาณสูงเพื่อการระบุชนิดและศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียนั้น

3.5 การศึกษาเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

นำจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถสร้างฮิสตามีนได้สูง (Strong histamine forming bacteria) มาศึกษาเพื่อระบุชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ตาม Krieg et al. (1984), Sneath et al. (1986), Holt et al. (1994) และ AOAC International (1998) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาคือ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรมของเซลล์ จากนั้นทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

เบื้องต้น โดยทดสอบ Oxidation-fermentation โดยใช้ Glucose O-F-medium ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่โดย Motility-test medium ทดสอบการย่อยเจลาติน โดย Nutrient-gelatin ทดสอบการสร้างเอนไซม์ caseinase amylase และ lipase โดย Starch agar และ Tween-80 agar และ Skimmed milk agar ตามลำดับ และระบุสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี API-20E , API-20NE และ API-staph (BIO-Merieux, Marcy-I ' Etoile, France)

3.6 การศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้สูงจากปลาสร้อยมาทดสอบการสร้างไบโอจินิกเอมีน โดยเตรียมเชื้ออายุ 20-24 ชั่วโมง ที่เจริญบน TSA agar และใส่เชื้อ 1 Loopful ลงในอาหารเหลว MØller ซึ่งเติม 0.4% L-lysine, L-histidine, L-ornithine และ L-tyrosine โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rodriguez-Jerez et al. (1994) และบ่มให้แบคทีเรียเจริญในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกที่ 13,000 rpm (Centrifuge 5415D,Eppendorf , Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไบโอจินิกเอมีนโดยใช้เครื่อง HPLC (Hewlett-Packard HP 1100, Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ Hypersil BDS C18 (3µm, 100 x 4 mm) (Agilent Technologies, USA) Mobile phase คือ ตัวทำละลาย A ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง Acetonitrile และ 0.02 M Acetic acid (1:9) ตัวทำละลาย B ซึ่งประกอบด้วย สารผสม 0.02M acetic acid, acetonitrile และ methanol (1:4.5:4.5) โดยทำให้คอลัมน์สมดุลด้วยตัวทำละลาย A และ B ในสัดส่วน 50%:50% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลาย B เป็น 90% ในนาทีที่ 25 ตรวจวัด dansylated amines โดย Diode array detector และปรับอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 28°ซ ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร และใช้ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm เป็นค่าอ้างอิง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

1.1 ผลของคุณภาพความสดต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีน

ตัวอย่างปลาสด (F) มีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทุกชนิดต่ำ แต่เมื่อเก็บที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 และ 16 ชั่วโมง คุณภาพความสดลดลง ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของปริมาณไตรเมทธิลเอมีน (TMA) ปริมาณแบสไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen, TVB-N) และปริมาณไบโอจีนิกเอมีน (ตารางที่ 2) จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า ตัวอย่างปลากะตักเก็บที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (8h) มีคุณภาพความสดปานกลาง ส่วนตัวอย่างซึ่งเก็บที่ 35°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (16h) เกิดการเน่าเสีย โดยสังเกตจากเนื้อสัมผัสที่ยุ่ยและและเกิดกลิ่นเน่าเหม็น ตัวอย่างดังกล่าวมีปริมาณไบโอจีนิกเอมีน 4 ชนิดที่ค่อนข้างสูงคือ ฮีสตามีน (200.7 มิลลิกรัม/100 กรัม) คาดาเวอรีน (86.3 มิลลิกรัม/100 กรัม) ไทรามีน (27.3 มิลลิกรัม/100 กรัม) และพิวเทรสซีน (26.0 มิลลิกรัม/100 กรัม) เนื่องจากพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่เสริมความเป็นพิษของฮีสตามีน (Stratton et al., 1991) ดังนั้นการเก็บปลาที่ 35°C เป็นเวลานานจึงไม่เหมาะสมสำหรับการบริโภคเป็นอาหาร มีรายงานการพบพิวเทรสซีนในปลา gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) ที่เน่าเสีย (Koutsoumanis et al., 1999). และยังพบการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีนในปลากะตัก (anchovy) สายพันธุ์ *Engraulis encrasicholus* ที่เน่าเสียที่ 8 and 22°ซ (Veciana-Nogués et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของคาดาเวอรีนในปลาทูน่าสายพันธุ์ Bigeye (*Thunnus obesus*) และ Skipjack (*Katsuwonus pelamis*) ที่เน่าเสียที่อุณหภูมิห้อง (Rossi et al., 2002) จากผลการศึกษานี้พบว่าไม่เพียงแต่ฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นในปลากะตักที่เน่าเสีย แต่ยังเกิดการสะสมของคาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน อีกด้วย

ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักของน้ำปลาที่ใช้ตัวอย่างปลาสด (F) เปลี่ยนแปลงน้อยมาก ฮีสตามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่มีค่าสูงสุดในระหว่างกระบวนการหมัก โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.3 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร เป็น 0.9 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 52 (1 ปี) (รูปที่ 1a) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างปลาสด (F) ซึ่งหมักที่ 40 °ซ มีลักษณะคล้ายกับตัวอย่างซึ่งหมักที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 2a) การหมักที่ 40°ซ ทำให้ได้น้ำปลาซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ประมาณ 2 กรัม/100 มิลลิลิตร ภายใน 13 สัปดาห์ อัตราการเพิ่มของไบโอจีนิกเอมีน

ตารางที่ 2 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนและดัชนีคุณภาพความสดทางเคมีอื่นๆ ในปลาทะตักเก็บที่ 35°ซ เป็นระยะเวลาต่างๆ

Chemical indicator (mg/100 g)	F	8h	16h
Tryptamine	N.D.	1.63±0.03	14.73±0.13
Putrescine	N.D.	1.38±0.04	25.99±0.12
Cadaverine	1.55±0.04	3.81±0.01	86.34±0.83
Histamine	1.40±0.002	3.28±0.001	200.70±0.94
Tyramine	4.69±0.13	5.44±0.08	27.30±0.99
Spermidine	4.93±0.09	7.14±0.03	5.52±0.14
Spermine	0.62±0.04	0.78±0.001	2.71±0.03
TMA	3.84±0.08	8.83±0.23	21.94±0.22
TVB-N[1]	30.52±0.31	46.47±2.05	90.12±0.92
Soluble oligopeptide[2]	79.02±3.21	118.06±2.42	143.26±2.17

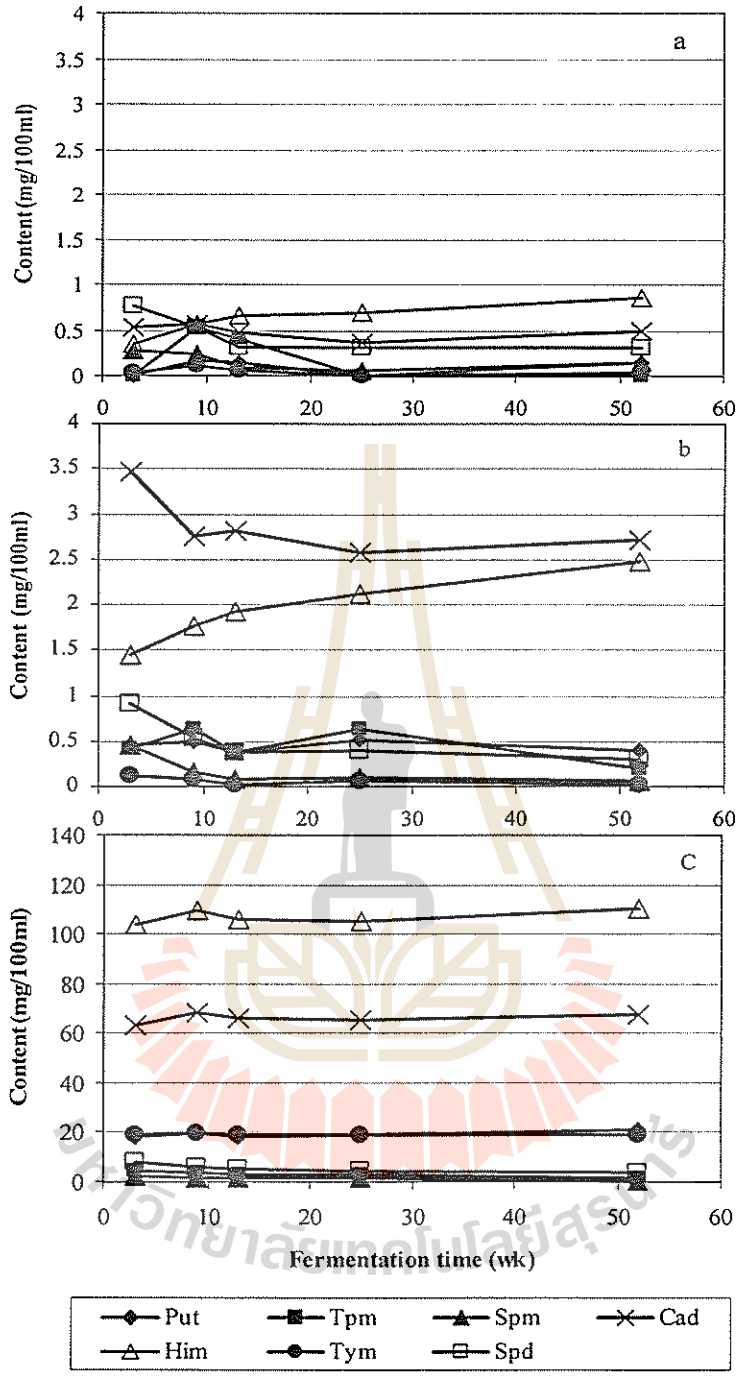
[1] mg-N/100g

[2] mmole/100g

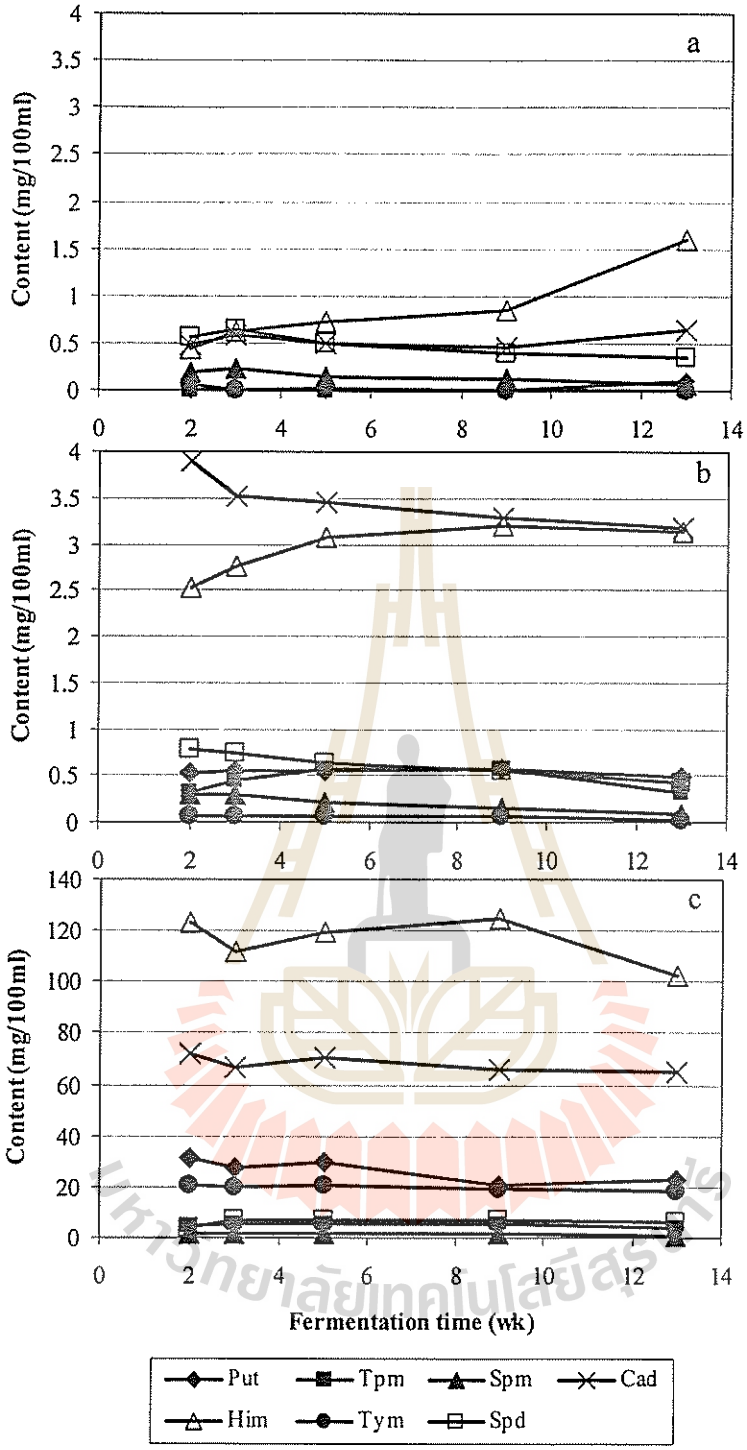
F = samples kept in ice after catch, 8h = samples incubated at 35 °C for 8 h, 16h = samples stored at 35 °C for 16 h.

N.D. = not detected

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ปลากะตักสด (a) ปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 8 ชั่วโมง (b) และปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 16 ชั่วโมง (c) **Put, putrescine; Tpm, tryptamine; Spm, spermine; Cad, cadaverine; Him, histamine; Tym, tyramine; Spd, spermidine.**



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่ 40°ซ โดยใช้ปลากะตักสด (a) ปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 8 ชั่วโมง (b) และปลากะตักเก็บที่ 35°ซ 16 ชั่วโมง (c) ตัวย่อตามรายละเอียดในรูปที่ 1

โดยเฉพาะฮีสตามีนในตัวอย่างที่หมักที่ 40°ซ มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่หมักที่อุณหภูมิห้อง โดยมีปริมาณฮีสตามีนหลังจากการหมักที่ 13 สัปดาห์เท่ากับ 1.6 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ถึงแม้ฮีสตามีนในตัวอย่างที่หมักที่ 40°ซ จะมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่หมักที่อุณหภูมิห้อง แต่ฮีสตามีนในระดับนี้จัดว่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของประเทศแคนาดา ซึ่งกำหนดให้มีปริมาณฮีสตามีนในปลาหมักดองได้ไม่เกิน 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (CFIA, 2000) เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตฮีสตามีนได้สูงที่คัดแยกจากปลากะตักได้แก่ *Morganella morganii, Proteus vulgaris, Enterobacter aerogenes* และ *Staphylococcus xylosus* ไม่สามารถเจริญและผลิตฮีสตามีนได้ที่เกลือเข้มข้น 20-25% NaCl (จิรวัฒน์ และคณะ 2546) จึงไม่มีการสร้างฮีสตามีนในระหว่างกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียเหล่านี้ แม้ว่าจะมีรายงานการพบแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างฮีสตามีนใน salted anchovy (*Engraulis encrasicholus*) และผลิตภัณฑ์ปลาดองเค็มอื่นๆ โดยแบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis, S. captitis,* และ *Tetragenococcus muriaticus* (Hernández-Herrero et al., 1999; Kimura et al., 2001) แต่จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ ไม่มีการตรวจพบแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงในน้ำปลา (จิรวัฒน์ และคณะ 2546) ดังนั้นปริมาณฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาที่หมักจากปลาสด จึงมาจากวัตถุดิบเริ่มต้นเป็นสำคัญ การสะสมสารดังกล่าวในระหว่างกระบวนการหมักมีน้อยมากหรือไม่เกิดขึ้นเลย เนื่องจากความเข้มข้นเกลือที่สูง (25-30%) มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตไบโอจีนิกเอมีนของจุลินทรีย์

สำหรับตัวอย่างที่มีความสดปานกลาง (8h) ปริมาณคาดาเวอรีนและฮีสตามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่มีปริมาณสูงที่พบทั้งในตัวอย่างที่หมักที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 1b) และตัวอย่างหมักที่ 40°ซ (รูปที่ 2b) โดยปริมาณฮีสตามีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในขณะที่คาดาเวอรีนมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการหมัก และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้ปริมาณฮีสตามีนเกินมาตรฐานที่กำหนด (20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาที่ผลิตจากปลากะตักสด (F) และสดปานกลาง (8h) มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดระยะเวลาการหมักทั้งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิการหมักที่ 40°ซ

ไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (16h) ซึ่งจัดเป็นปลาที่เกิดการเน่าเสียแล้ว คือ ฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน (รูปที่ 1c, 2c) ไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิดนั้นเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบมากในปลากะตักที่เน่าเสียเช่นกัน (ตารางที่ 2) การเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนตลอดระยะเวลาการหมักทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ เกิดขึ้นน้อยมาก ($p>0.05$) นอกจากนี้ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของตัวอย่างที่หมักที่อุณหภูมิห้องไม่แตกต่างจากที่ 40°ซ ($p>0.05$) ส่วนสเปอมีน สเปอมิดีน และทริพทามีน มีค่าน้อยกว่า 10 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรตลอดระยะเวลาการหมักที่ 2 อุณหภูมิ (รูปที่ 1c, 2c) Sanceda et al. (1999) รายงานว่าปริมาณฮีสตามีน

มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วงระยะเวลาการหมักน้ำปลา 50 วันแรก Kirschbaum et al. (2000) พบปริมาณฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน ที่สูงในน้ำปลาจากปลากะตัก โดยมีค่า 72.1-75.7, 10.8-28.5, 33.7-73.9 และ 10.8-19.7 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร, ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบไบโอจีนิกเมีนทั้ง 4 ชนิดในผลิตภัณฑ์ปลากะตักหมักดองเค็ม (salted and fermented anchovy) (Mah et al., 2002) ดังนั้นไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิดคือ ฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน จึงเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญในผลิตภัณฑ์จากปลากะตัก รวมถึงน้ำปลา โดยเฉพาะน้ำปลาที่ผลิตจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพความสดต่ำ จะมีไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิดนี้สูง Veciana-Nogues et al. (1996) พบว่าการเพิ่มขึ้นของไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างการหมัก semipreserved anchovies (*Engraulis encrasicholus*) มีน้อยมากอย่างไม่มีนัยสำคัญ คุณภาพความสดของวัตถุดิบปลาเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์

ปริมาณฮีสตามีนของน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดคือ 20.97-78.30 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นค่าที่สูงเกินมาตรฐานของประเทศแคนาดา (20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลา แต่กองควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง มีข้อแนะนำว่าควรมีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่า 50 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (FIQD, 2000) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายบางผลิตภัณฑ์ยังคงมีปริมาณฮีสตามีนเกินกว่าข้อแนะนำของกรมประมง นอกจากนี้ยังพบคาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน ในระดับสูงในตัวอย่างที่มีฮีสตามีนสูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองหมักในระดับห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 1, 2) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นค่อนข้างน้อยตลอดระยะเวลาการหมัก ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนที่พบในผลิตภัณฑ์จึงมีแนวโน้มที่จะมาจากวัตถุดิบเป็นสำคัญ และจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักพบว่าการสะสมของไบโอจีนิกทั้ง 4 ชนิดนี้จะเกิดขึ้นในตัวอย่างที่เกิดการเน่าเสีย ดังนั้นอาจสันนิษฐานว่าปลากะตักที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลาทางการค้า อาจมีคุณภาพความสดไม่ดีนัก และอาจเป็นปลาที่มีการเน่าเสีย ดังนั้นฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน อาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลาได้ และยังสะท้อนถึงคุณภาพของปลาซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลาอีกด้วย การพบไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิดในระดับสูงในน้ำปลา เป็นการบ่งชี้ว่าคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตต่ำ และ/หรือไม่ถูกสุขอนามัย

หากน้ำปลานั้นผลิตจากวัตถุดิบปลาที่ไม่สด "หัวน้ำปลา" ซึ่งเป็นน้ำปลาที่ได้จากการหมักครั้งแรก จะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีไบโอจีนิกเอมีนสูงกว่าน้ำปลาคุณภาพรองลงมาซึ่งได้จากการหมักกากปลาด้วยน้ำเกลือ ตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (สมอ.) น้ำปลาคุณภาพชั้นที่ 1 จะต้องมีปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 2 กรัม/100 มิลลิลิตร จากตารางที่ 3 ตัวอย่างน้ำปลา C1-C3

ตารางที่ 3 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน ไนโตรเจนทั้งหมด และแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาทางการค้า[1]

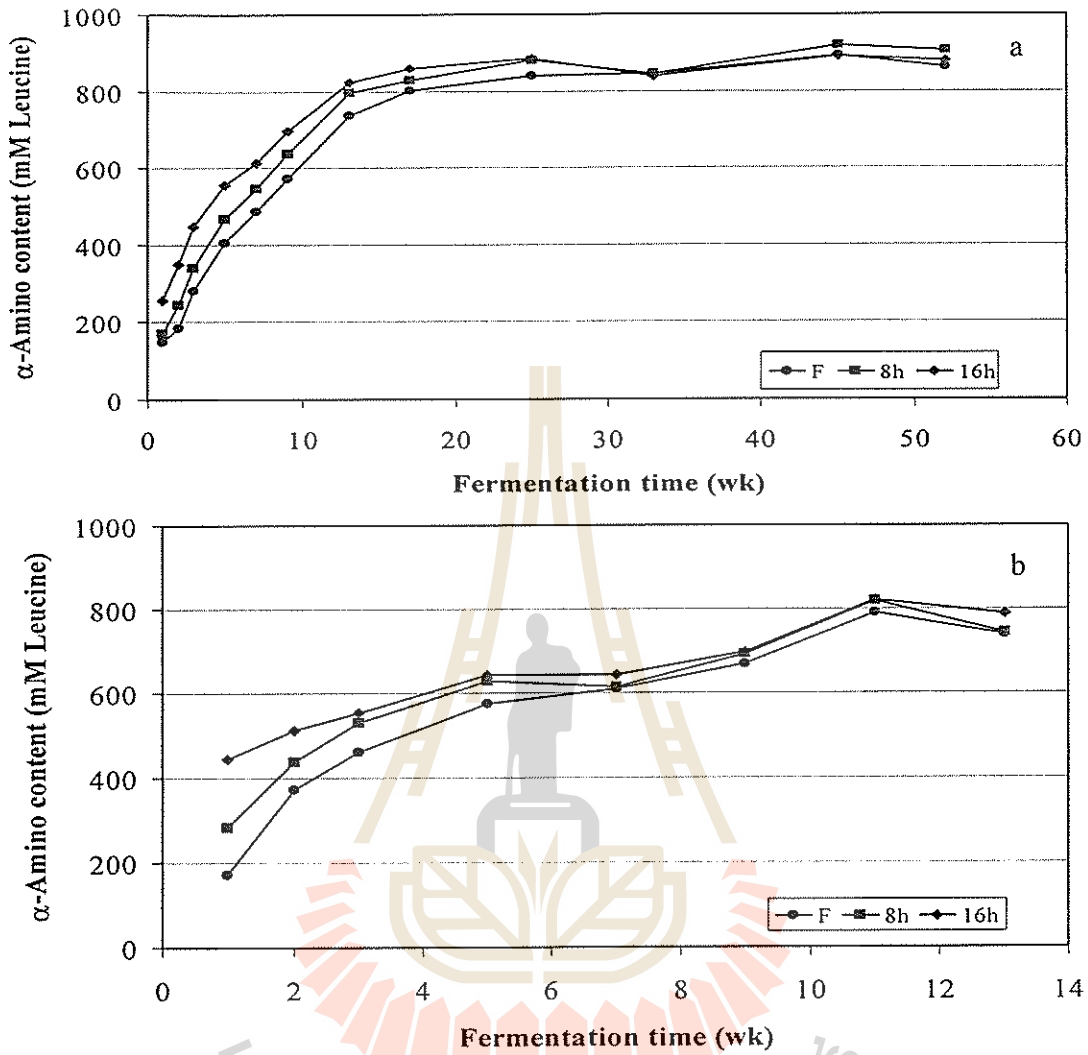
Sample	Biogenic amine (mg/100 mL)							Total Nitrogen (g-N/100 ml)	Soluble peptides[2] (mM)
	Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Spermidine	Spermine		
C1	3.05±2.20	30.82±1.75	68.55±4.09	57.47±4.77	11.73±1.27	0.99±0.07	0.37±0.007	2.72±0.05	1062.69±20.93
C2	1.24±0.01	4.21±0.51	8.66±0.91	20.97±2.72	0.44±0.07	0.28±0.06	0.06±0.03	2.04±0.05	828.48±17.24
C3	1.99±0.24	3.41±0.20	8.66±0.81	14.14±1.22	0.37±0.006	0.26±0.002	0.05±0.008	2.08±0.06	914.68±20.93
C4	4.55±0.12	47.22±1.91	75.57±3.12	78.30±4.27	23.19±0.66	1.73±0.10	0.77±0.002	1.92±0.02	750.13±4.93
C5	5.80±0.13	36.74±1.69	60.35±2.83	60.81±2.74	23.77±1.00	1.87±0.05	0.82±0.03	1.55±0.005	616.04±2.46
C6	3.29±0.48	15.52±1.12	29.07±2.15	31.70±2.45	10.34±0.59	4.95±0.08	1.06±0.19	1.04±0.005	400.99±8.62

[1] Means±standard deviation

จัดเป็นน้ำปลาคุณภาพชั้นที่ 1 ส่วนตัวอย่างน้ำปลา C4-C6 จัดเป็นน้ำปลาที่มีคุณภาพรองลงมา ตัวอย่างน้ำปลา C6 ซึ่งเป็นน้ำปลาเกรดรองยังมีปริมาณฮีสตามีนที่สูงเกิน 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร แสดงว่าปลาที่ใช้ในการผลิตมีคุณภาพไม่สดมาก ในทางตรงกันข้าม ตัวอย่างน้ำปลา C2 และ C3 ซึ่งเป็นน้ำปลาคุณภาพชั้นที่ 1 แต่มีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่า 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร และหากเปรียบเทียบคุณภาพน้ำปลา C1 และ C3 โดยใช้เกณฑ์ไนโตรเจนรวมทั้งหมดเต่เพียงอย่างเดียว อาจสรุปว่าน้ำปลา C1 มีคุณภาพสูงกว่าน้ำปลา C3 แต่หากพิจารณาปริมาณไบโอจีนิกเอมีนร่วมด้วยจะเห็นว่า ตัวอย่างน้ำปลา C1 มีไบโอจีนิกเอมีนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งบ่งชี้ว่าปลาที่ใช้ในการผลิตอาจมีคุณภาพต่ำกว่าปลาที่ใช้ในการผลิตน้ำปลา C3 จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าการใช้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดเป็นเกณฑ์ในการจำแนกคุณภาพของน้ำปลาแต่เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ และไม่ได้สะท้อนถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์และคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอย่างแท้จริง ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีน คาดาเวอรีน ไทรามีนและพิวเทรสซีน สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลาได้อีกทางหนึ่ง

1.2 การเปลี่ยนแปลงของแอลฟาอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมัก

การย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักทำให้ได้เปปไทด์ที่ละลายได้ (soluble peptides) และกรดอะมิโน ซึ่งมีกลุ่มอะมิโนที่ตำแหน่งแอลฟา (α-amino) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสาร TNBS ได้ (Fields, 1971) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลฟาอะมิโนจึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงระดับการย่อยสลายของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักได้ แอลฟาอะมิโนของตัวอย่างที่หมักโดยใช้ปลา 16h มีค่าสูงกว่าตัวอย่างปลาสด (F และ 8h) ทั้งในตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิห้องและที่ 40°ซ (รูปที่ 3a, b) ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างปลากะตัก 16h มีปริมาณแอลฟาอะมิโนเริ่มต้นที่สูงกว่าตัวอย่างปลาสด (F และ 8h) (ตารางที่ 2) เมื่อปลาเกิดการเน่าเสีย โปรตีนกล้ามเนื้อจะถูกย่อยสลายโดยโปรติเนสจากกล้ามเนื้อปลา (endogenous proteinases) และโปรติเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการเก็บปลาที่ 35°C เป็นเวลานานจึงทำให้ปริมาณแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลา 13 สัปดาห์แรกของการหมัก (รูปที่ 3a) หลังจากนั้นการเปลี่ยนแปลงของแอลฟาอะมิโนเกิดขึ้นน้อยมากในช่วงสัปดาห์ที่ 13-52 ปริมาณแอลฟาอะมิโน ในสัปดาห์ที่ 13 ของทุกตัวอย่างอยู่ในช่วง 736-822 มิลลิโมลาร์ และเพิ่มขึ้นเป็น 860-878 มิลลิโมลาร์ในสัปดาห์ที่ 52 ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่หมักเป็นเวลา 13 สัปดาห์ ยังไม่มีลักษณะของน้ำปลา โดยมีกลิ่นคาวและสีน้ำตาลอ่อน กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นระหว่างสัปดาห์ที่ 13 – 52 ทำให้เกิดกลิ่น รสของน้ำปลา ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในปลา เช่น aminopeptidase (Vo-Van et al., 1984) หรือจากจุลินทรีย์ชอบเค็ม



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟาอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ 40°ซ (b) F=ปลาสด, 8h และ 16h=บ่มปลาที่ 35°ซ เป็นเวลา 8 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ

(Gildberg and Thongthai 2001; Saisithi 1994) ซึ่งเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาถูกจำกัดด้วยสภาวะที่มีเกลือสูง ประเด็นที่น่าสนใจคือการใช้วัตถุดิบที่เกิดการเน่าเสีย (16h) ไม่ได้เร่งกระบวนการหมักอย่างที่เข้าใจกันในกลุ่มผู้ประกอบการ ปริมาณแอลฟาอะมิโนในตัวอย่างปลา 16h สูง

กว่าตัวอย่างอื่นในช่วง 33 สัปดาห์แรกของการหมักเท่านั้น (รูปที่ 3a) หลังจากนั้นปริมาณแอลฟาอะมิโนไม่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่หมักด้วยปลาสด F หรือ 8h ($p>0.05$)

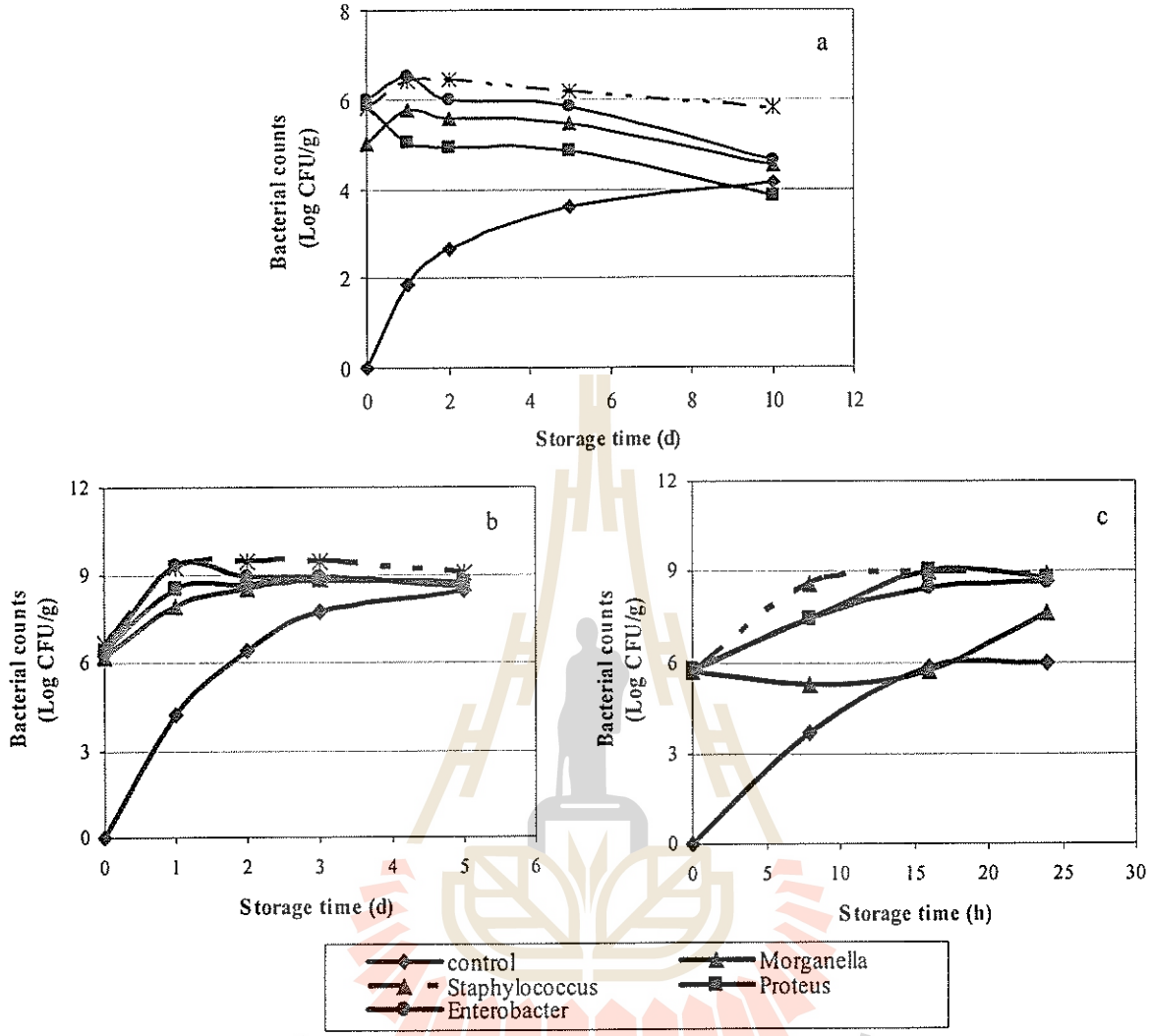
ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ของตัวอย่างบ่มที่ 40°ซ มีค่าสูงกว่าตัวอย่างหมักที่อุณหภูมิห้อง ($p<0.05$) (รูปที่ 3a,b) การหมักที่อุณหภูมิสูง (40°ซ) อาจส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเนสจากปลา (endogenous proteinases) มากขึ้น Sirighan et al. (2003) พบว่าโปรติเนสในปลากะตักสามารถย่อยสลายโปรตีนได้เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยสามารถย่อยสลายได้ดีที่สุดในช่วง 60-65°ซ ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ของตัวอย่างหมักที่ 40°ซ เป็นเวลา 13 สัปดาห์ มีค่าประมาณ 700-800 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 3b) ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับในผลิตภัณฑ์น้ำปลา (ตารางที่ 3) ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิในการหมักอาจเป็นแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนการหมักของน้ำปลาได้

การทดลองที่ 2 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดยแบคทีเรียที่แยกจากปลากะตัก

จากการวิจัยก่อนหน้านี้ (จิรวัฒน์ และคณะ 2546) สามารถแยก คัดเลือก และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่สร้างฮีสตามีนได้สูงในปลากะตัก คือ *Morganella morganii, Enterobacter aerogenes, Staphylococcus xylosus* และ *Proteus vulgaris* อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาข้างต้นของโครงการวิจัยนี้เห็นได้ว่าเมื่อปลากะตักเกิดการเน่าเสีย ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นนอกจากฮีสตามีน เช่น คาดาเวอรีน ไทรามีน และพิวเทรสซีน ก็มีค่าสูงเช่นกัน (ตารางที่ 2) ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญในปลากะตักที่เน่าเสียไม่เพียงแต่สร้างฮีสตามีนเท่านั้น แต่ยังสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการทดลองในส่วนนี้ จึงเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากะตักที่เน่าเสียและได้ทดสอบแล้วว่าสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูง

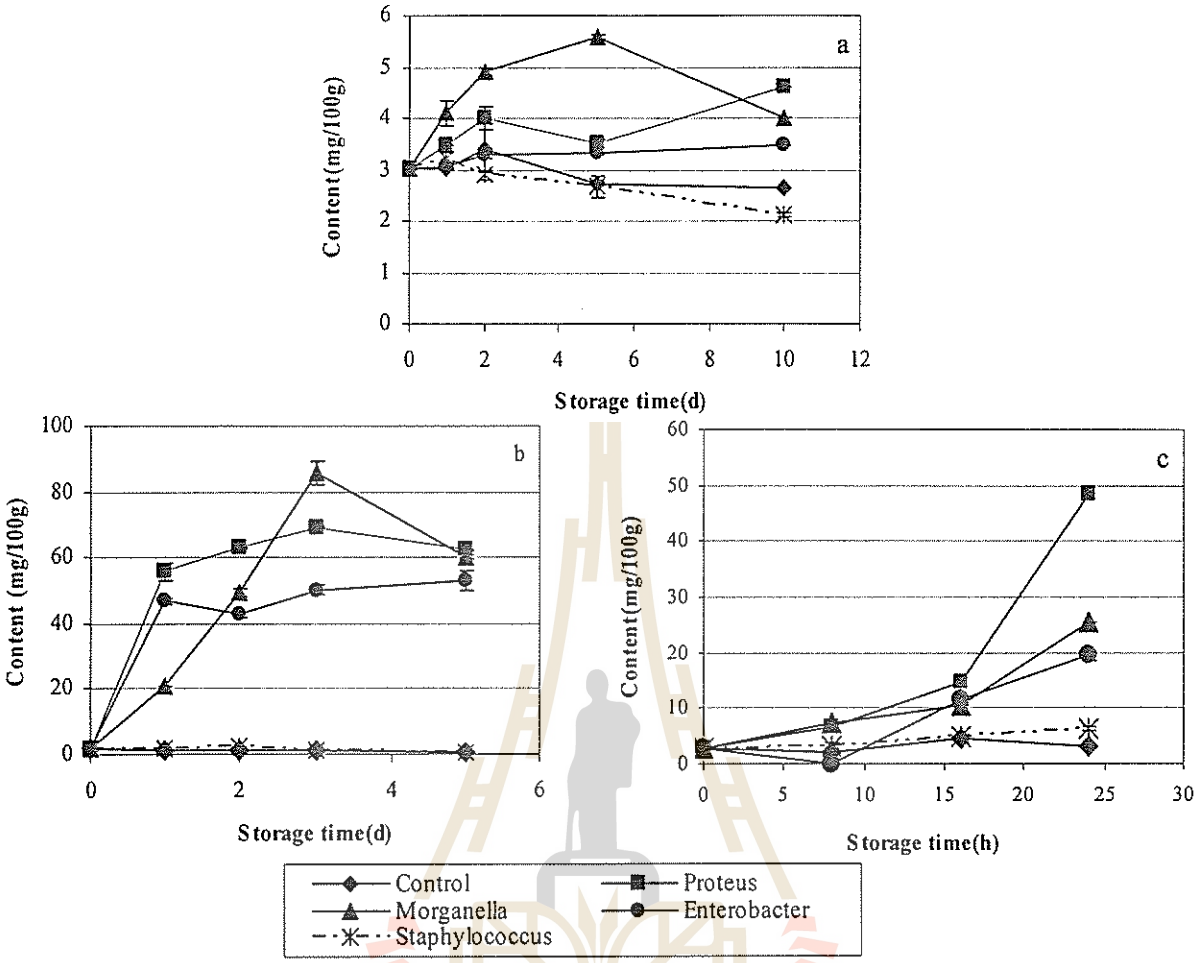
2.1 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตัก

การลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลากะตักเริ่มต้น โดยล้างด้วยสารผสมเอทธานอลและอะซีโทน สามารถลดปริมาณเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รูปที่ 4) แต่วิธีดังกล่าวยังไม่สามารถทำให้ตัวอย่างปลากะตักปลอดเชื้อโดยสมบูรณ์ ดังจะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อของตัวอย่างควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บ โดยปริมาณเชื้อเพิ่มสูงเป็น 10^4 cfu/g เมื่อบ่มที่ 0°C เป็นเวลา 10 วัน และมีปริมาณเพิ่มสูงถึง 10^7 -10^9 เมื่อบ่มที่ 15 และ 35°ซ (รูปที่ 1) การเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้อาจมาจาก microflora ในระบบทางเดินอาหารของปลากะตัก ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทธานอลและอะซีโทน จึง



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ของตัวอย่างปลากะตักที่ inoculate ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ และเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c)

ไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารในตัวปลาได้ ประกอบกับตัวปลากะตักมีขนาดเล็กเกินกว่าจะแยกส่วนทำความสะอาด และเมื่อบ่มตัวอย่างจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงสามารถเจริญและเพิ่มจำนวน ส่วนแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่เติม (inoculate) ลงในตัวอย่างปลากะตัก มีการเพิ่มจำนวนประชากรประมาณ 3 log cycle เมื่อบ่มที่ 15°ซในช่วงระยะเวลาการบ่ม 1 วันแรก และภายใน16 ชั่วโมงที่ 35°ซ ส่วนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ 0°ซ มีค่อนข้างน้อย ดังจะเห็นได้จากจำนวน



รูปที่ 5 การสร้างฮีสตามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

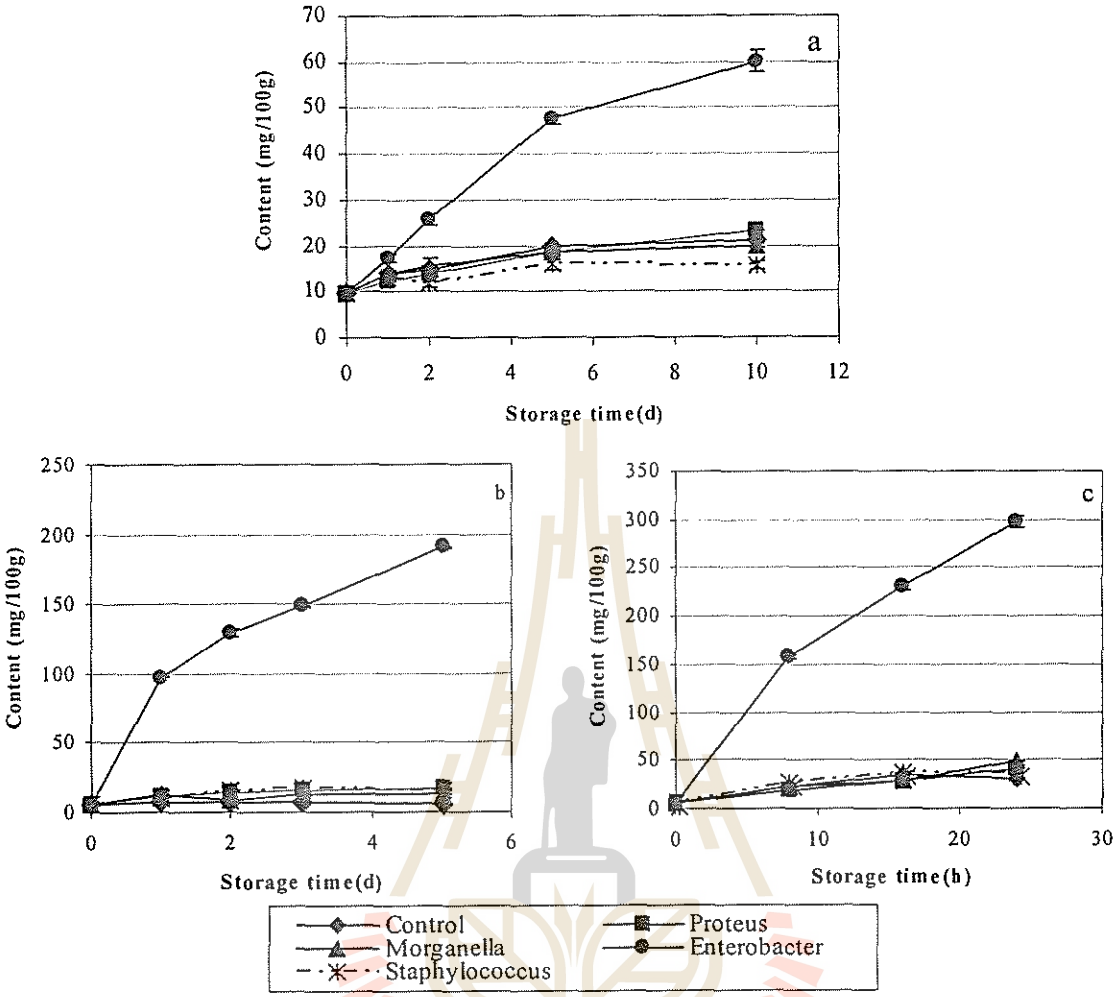
จุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลา 10 วัน แม้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ของตัวอย่างควบคุม (ไม่ได้เติมเชื้อ) จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บที่ 0°ซ (รูปที่ 4a) แต่ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างดังกล่าวมีค่อนข้างน้อยคงที่คือประมาณ 3 มิลลิกรัม/100 กรัม ตลอดระยะเวลาการเก็บ 10 วัน (รูปที่ 2a) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างควบคุมไม่มีผลต่อการสร้างฮีสตามีน ปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นจึงมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใส่ (inoculate) ลงไปเท่านั้น

การสะสมของฮีสตามีนเกิดขึ้นค่อนข้างน้อยที่ 0°ซ ในช่วงระยะเวลาเก็บ 10 วัน *Morganella morganii* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตฮีสตามีนได้สูงสุดที่ 0°ซ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น (รูปที่ 5a) ส่วน

ที่ 15°ซ พบว่า *Morganella morganii, Proteus vulgaris* และ *Enterobacter aerogenes* เป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูง (รูปที่ 5b) โดย *Morganella morganii* สร้างได้สูงสุดถึง 85.9 มิลลิกรัม/100 กรัม ในวันที่ 3 ของการเก็บ เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณฮีสตามีนเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ของการเก็บที่ 15°ซ โดยเฉพาะในกรณีของ *Proteus vulgaris* และ *Enterobacter aerogenes* ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่ 15°ซ (รูปที่ 4a) ในขณะที่ *Staphylococcus xylosus* สร้างฮีสตามีนได้ค่อนข้างต่ำตลอดระยะเวลาการเก็บที่ 15°ซ แม้จะมีจำนวนประชากรใกล้เคียงกับเชื้ออีก 3 ชนิดก็ตาม ดังนั้น *Morganella morganii, Proteus vulgaris* และ *Enterobacter aerogenes* จึงเป็นแบคทีเรียสำคัญที่มีบทบาทต่อการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลากะตักที่เน่าเสียที่ 15°ซ

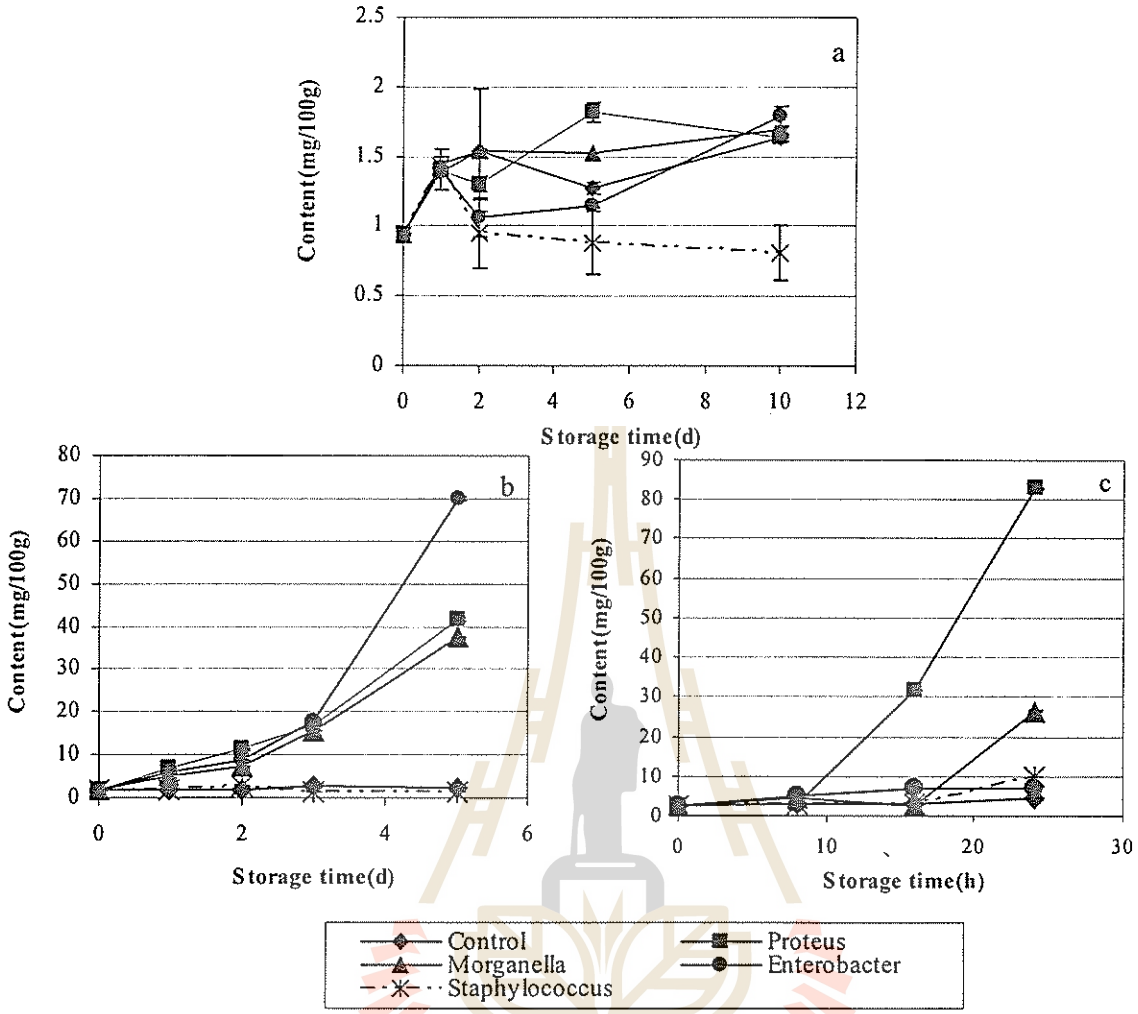
ปริมาณฮีสตามีนที่สร้างโดย *Morganella morganii* และ *Proteus vulgaris* เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเก็บที่ 35°ซ โดย *Proteus vulgaris* สร้างฮีสตามีนได้สูงสุด (ประมาณ 50 มิลลิกรัม/100 กรัม) หลังจากเก็บที่ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 5c) จะเห็นได้ว่าปริมาณฮีสตามีนของตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Proteus vulgaris* และ *Enterobacter aerogenes* ที่ 15°ซ ในวันที่ 1 มีค่ามากกว่าตัวอย่างเก็บที่ 35°ซ ในช่วงเวลาเดียวกัน (รูปที่ 5b,c) และเมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์แล้วพบว่าที่ 2 สภาวะ (15 และ 35°ซ/1 วัน) มีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตฮีสตามีนที่ 15°ซ ได้ดีกว่าหรือเทียบเท่ากับที่ 35°ซ ส่วน *Staphylococcus xylosus* สร้างฮีสตามีนได้ต่ำสุดและเป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างควบคุมมีปริมาณฮีสตามีนต่ำเช่นกัน แสดงว่าจุลินทรีย์ที่เจริญในตัวอย่างควบคุมอาจไม่มีบทบาทในการสร้างฮีสตามีน

Enterobacter aerogenes มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างคาดาเวอรีนในปลากะตักทั้ง 3 สภาวะการเก็บ (รูปที่ 6a-c) ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสร้างคาดาเวอรีนได้ต่ำ ปริมาณพิวเทรสซีนในตัวอย่างปลากะตักมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่สภาวะการเก็บ 0°ซ (รูปที่ 7a) แต่ปริมาณพิวเทรสซีนของตัวอย่างที่เติม (inoculate) *Morganella morganii, Proteus vulgaris* และ *Enterobacter aerogenes* เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บที่ 15°ซ (รูปที่ 7b) นอกจากนี้ *Proteus vulgaris* สามารถสร้างพิวเทรสซีนได้สูงสุดที่ 35°ซ โดยเฉพาะหลังจากบ่มเป็นเวลามากกว่า 8 ชั่วโมง (รูปที่ 7c) *Morganella morganii* เป็นแบคทีเรียที่สร้างพิวเทรสซีนในปลากะตักหลังจากบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสร้างพิวเทรสซีนได้น้อยกว่า 10 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 24



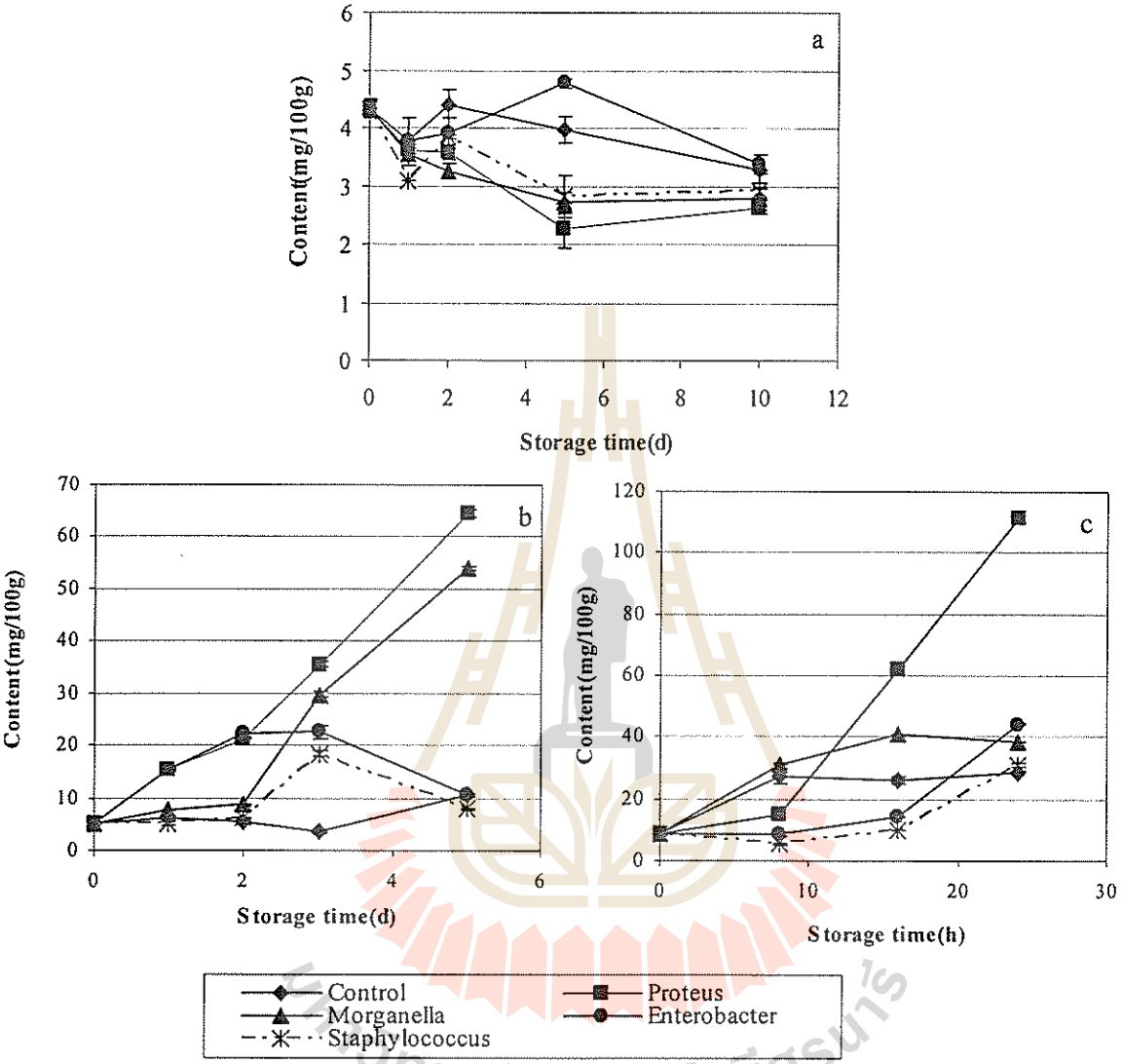
รูปที่ 6 การสร้างคาดาเวอรีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโตน และเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

ชั่วโมง เป็นที่น่าสังเกตว่าพิวเทรสซีนเพิ่มสูงขึ้นในช่วงระยะหลังของการเก็บที่ 15 และ 35°ซ โดย *Proteus vulgaris* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเพิ่มขึ้นของพิวเทรสซีนในปลากะตักเมื่อเก็บที่ 15 และ 35°ซ



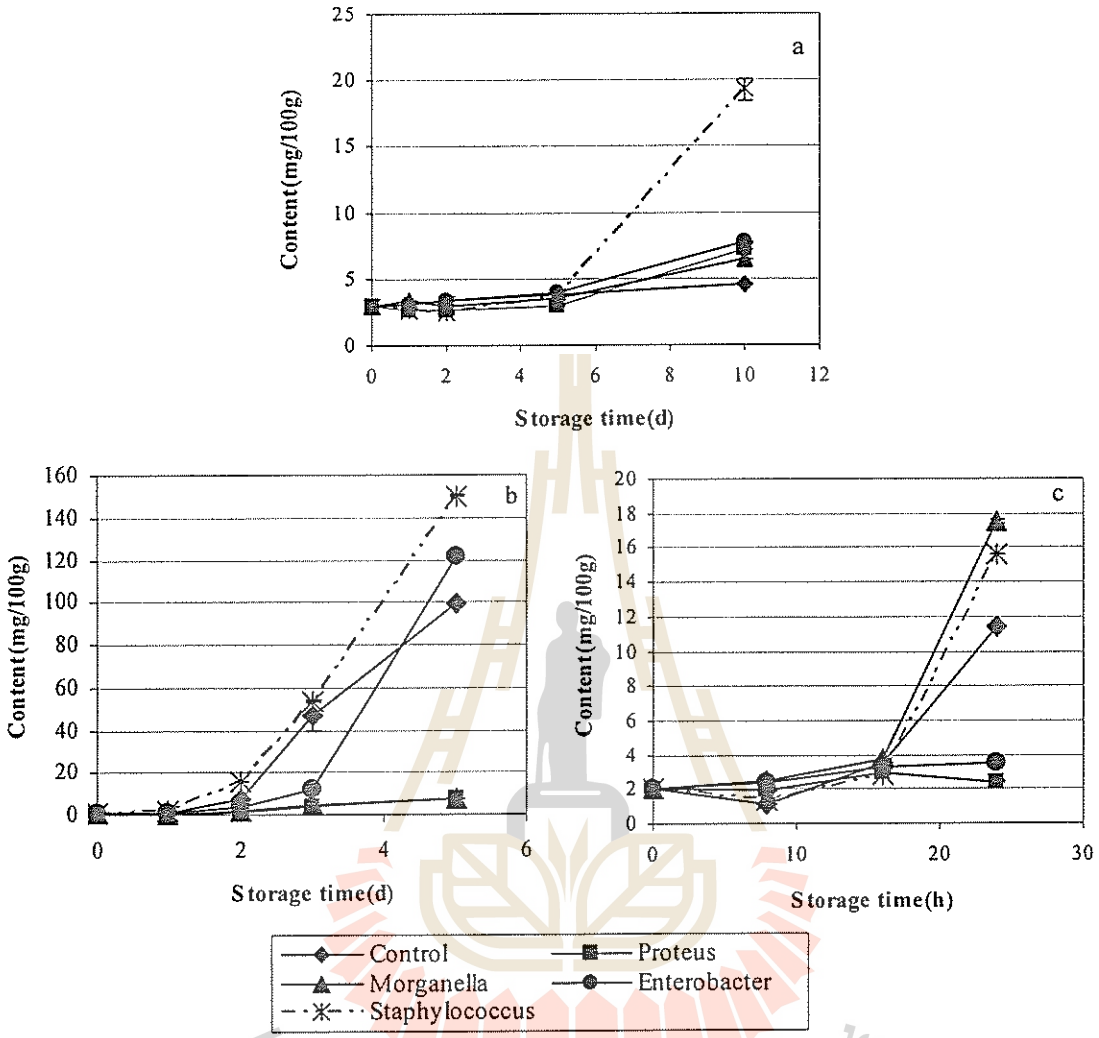
รูปที่ 7 การสร้างพิวเทรสซีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโตนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

ปริมาณทริพทามีนของตัวอย่างเก็บที่ 0°ซ มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บ (รูปที่ 8a) แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการสะสมของทริพทามีนที่ 0°ซ



รูปที่ 8 การสร้างทริพทามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

อย่างไรก็ตาม *Morganella morganii* และ *Proteus vulgaris* มีผลทำให้ปริมาณทริพทามีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มที่ 15°ซ โดยเฉพาะในหลังของการเก็บเป็นเวลา 3 วัน เป็นต้นไป (รูปที่ 8b) นอกจากนี้ *Proteus vulgaris* ยังเป็นแบคทีเรียที่มีส่วนทำให้ปริมาณทริพทามีนในปลากะตักเก็บที่ 35°ซ เพิ่มขึ้น (รูปที่ 8c)



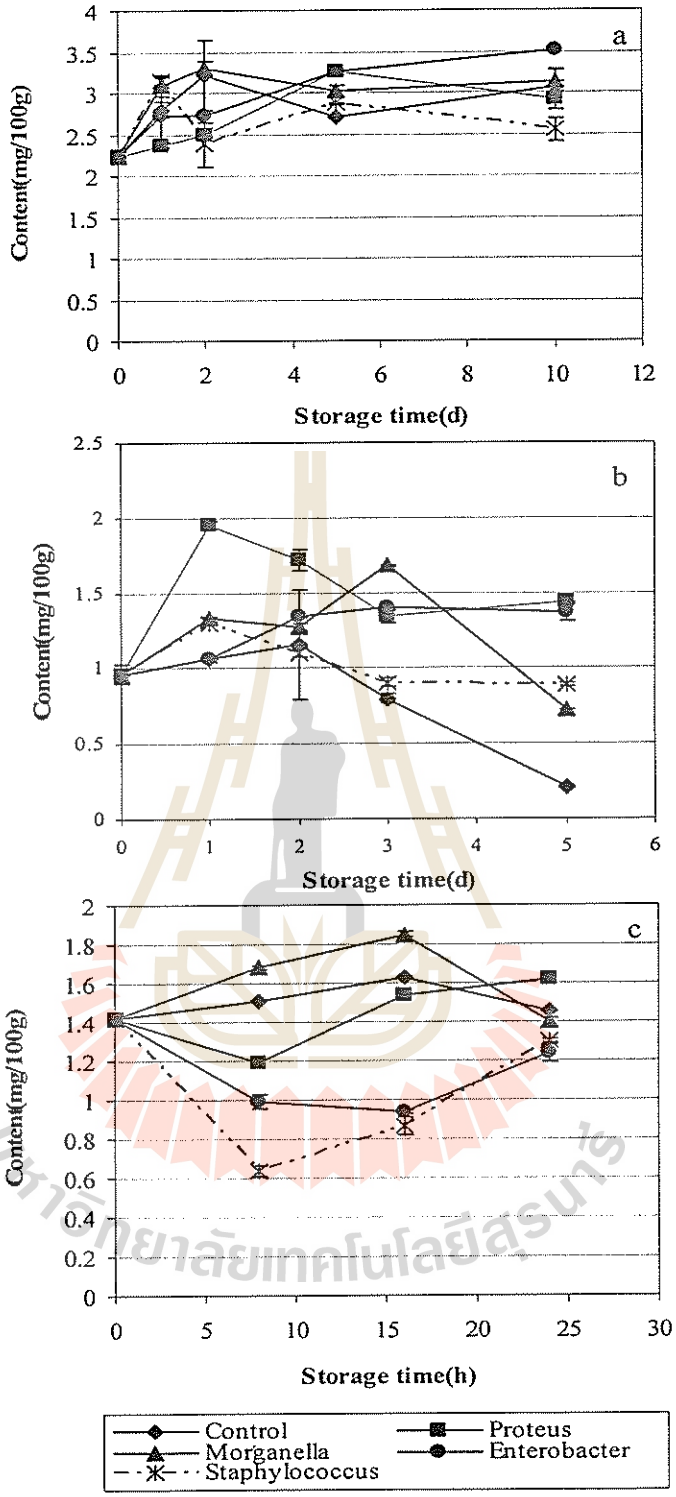
รูปที่ 9 การสร้างไทรามีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

Staphylococcus xylosus เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการสร้างไทรามีนในปลากะตักเก็บที่ 0°ซ (รูปที่ 9a) ในขณะที่ *Staphylococcus xylosus* และ *Morganella morganii* มีบทบาทต่อการเพิ่มขึ้นของไทรามีนในตัวอย่างเก็บที่ 15 และ 35°ซ โดยเฉพาะในวันที่ 5 และวันที่ 1 ของการเก็บ ตามลำดับ (รูปที่ 9b, c) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณไทรามีนที่ 15°ซ มีค่าสูงกว่าที่ 35°ซ ดังนั้นการสะสมของไทรา-

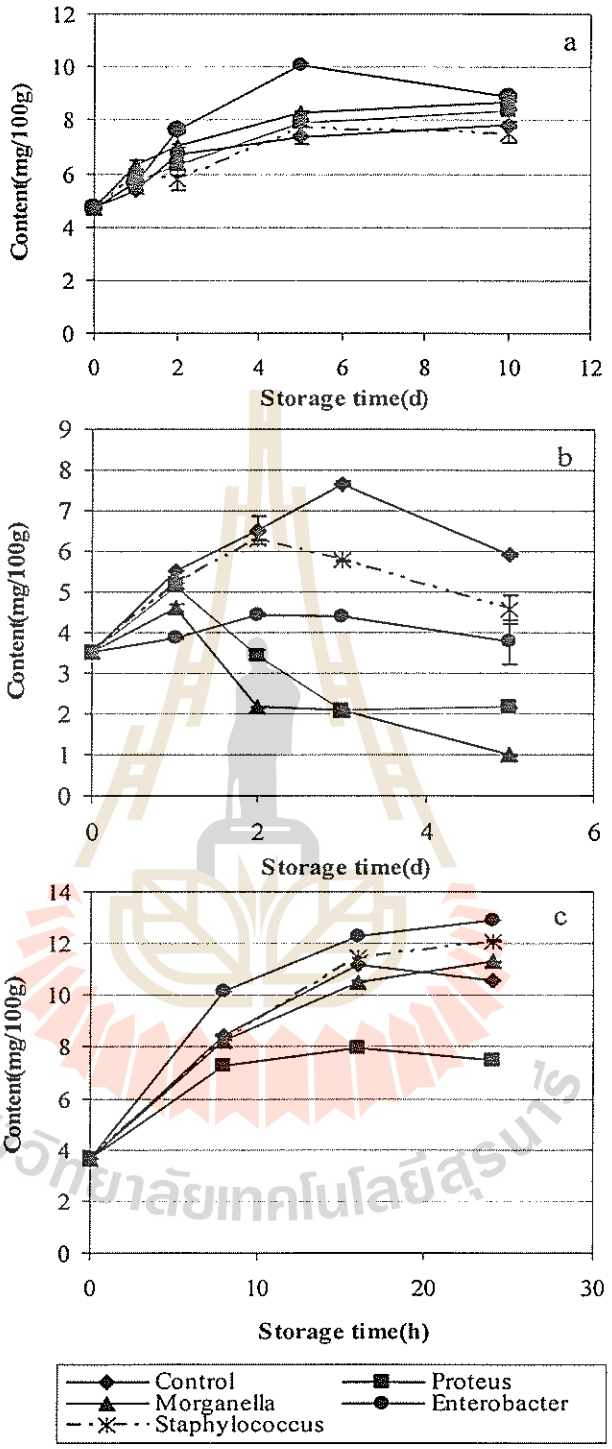
มีนเป็นปัญหาสำคัญของปลากะตักเก็บที่ 15°ซ มากกว่าที่ 35°C โดยเฉพาะหากมีการปนเปื้อนของ *Staphylococcus xylosus* และ *Morganella morganii* นอกจากนี้ตัวอย่างควบคุมซึ่งเก็บที่ 15°C มีการเพิ่มขึ้นของไทรามีนเช่นกัน โดยมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับตัวอย่างที่มี *Staphylococcus xylosus* เป็นที่น่าสังเกตว่าไทรามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนชนิดเดียวที่มีการเพิ่มขึ้นในตัวอย่างควบคุม เนื่องจากมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในตัวอย่างควบคุมซึ่งเก็บที่ 15 และ 35°C จุลินทรีย์ดังกล่าวอาจมีบทบาทในการสร้างไทรามีนในปลากะตัก

สเปอมีนและสเปอมิดีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นๆ ที่กล่าวในข้างต้น สภาวะในการเก็บที่ 3 อุณหภูมิไม่มีผลต่อการสะสมของทั้งสเปอมีนและสเปอมิดีน (รูปที่ 10-11) จุลินทรีย์ที่หลงเหลือจากการล้างในตัวอย่างควบคุม มีแนวโน้มทำให้เกิดการสะสมของสเปอมิดีนสูงกว่าในตัวอย่างอื่นโดยเฉพาะที่ 15°ซ (รูปที่ 11b) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของสเปอมิดีนที่อุณหภูมิดังกล่าวมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Staphylococcus xylosus* ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่หลังจากการล้างปลากะตักด้วยเอทธานอล-อะซีโทน เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสเปอมิดีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 10 การสร้างสเปอมีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลาทะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 11 การสร้างสเปอมิดีนของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ในปลากะตักที่ล้างด้วยเอทธานอล-อะซีโทนและเก็บที่ 0 (a), 15(b) และ 35°ซ (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

2.2 การสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว

เพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์มีบทบาทในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนดังผลข้างต้น จึงได้ศึกษาถึงความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว MØller เนื่องจากที่ 0°ซ มีการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนค่อนข้างน้อย (รูปที่ 5a-11a) จึงเลือกเลือกศึกษาเฉพาะที่ 15 และ 35°ซ เนื่องจากอุณหภูมิทั้ง 2 ทำให้เกิดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนบางชนิดที่ค่อนข้างสูง

ที่ 15°ซ *Proteus vulgaris* และ *Staphylococcus xylosus* สร้างฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ ได้ค่อนข้างน้อยในอาหารเหลว (ตารางที่ 4) ซึ่งผลดังกล่าวค่อนข้างแตกต่างจากการทดสอบโดยการเติมเชื้อในปลากะตัก ซึ่งพบว่า *Proteus vulgaris* มีบทบาทสำคัญต่อการสะสมของฮีสตามีน (รูปที่ 5b) และพิวเทรสซีน (รูปที่ 7b) ในขณะที่ *Staphylococcus xylosus* มีบทบาทต่อการเพิ่มขึ้นของไทรามีนในตัวอย่างปลากะตัก (รูปที่ 9b) ที่ 15°ซ นอกจากนี้ *Enterobacter aerogenes* สามารถสร้างคาดาเวอรีนได้สูง (ตารางที่ 4) ที่ 15°C แต่สร้างฮีสตามีนและสร้างพิวเทรสซีนได้ค่อนข้างต่ำ ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเหลวนี้ แตกต่างจากผลที่ได้เมื่อทดสอบในปลากะตัก ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบของกรดอะมิโนในปลากะตักและในอาหารเหลว ปริมาณกรดอะมิโนที่มีจำกัดในอาหารเหลวอาจทำให้ความสามารถในเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียมีน้อยกว่า *Morganella morganii* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวที่มีความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างปลากะตักเหมือนกับในอาหารเหลว โดยเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการสะสมของฮีสตามีนและพิวเทรสซีนได้สูงแต่สร้างคาดาเวอรีนได้ต่ำ

เมื่อบ่มเชื้อที่ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า *Proteus vulgaris* สามารถสร้างพิวเทรสซีนและฮีสตามีนได้สูง (ตารางที่ 5) ในขณะที่ *Enterobacter aerogenes* และ *Staphylococcus xylosus* สามารถสร้างทั้งพิวเทรสซีน คาดาเวอรีน และฮีสตามีนได้สูง และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างในปลากะตักพบว่า *Enterobacter aerogenes* สร้างฮีสตามีน (รูปที่ 5c) และคาดาเวอรีน (รูปที่ 6c) ได้สูง แต่สร้างพิวเทรสซีน (รูปที่ 7c) ได้ต่ำ ในขณะที่ *Staphylococcus xylosus* สามารถสร้างไทรามีนได้สูงในระบบที่ทดสอบด้วยปลากะตัก (รูปที่ 9c) จะเห็นได้ว่าความสามารถในการสร้างไบโอจินิกเอมีนใน

ตารางที่ 4 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว MØller ที่ 15°ซ ของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่แยกจากปลาทะเลที่เน่าเสีย

Bacterial strain	Content (mg/100 ml)						
	Put	Cad	Him	Tym	Spd	Spm	Trm
Proteus							
KP1-6	0.32	ND	1.22	0.41	0.35	0.09	0.21
	(0.01)		(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)
Enterobacter							
KN2-16	4.57	38.24	ND	0.44	0.37	0.10	0.12
	(0.06)	(0.13)		(0.01)	(0.00)	(0.01)	(0.02)
KN2-20	4.05	27.43	ND	0.49	0.42	0.09	0.15
	(0.01)	(0.13)		(0.01)	(0.00)	(0.00)	(0.01)
Morganella							
KP2-12	113.88	ND	124.08	0.29	0.24	0.12	0.88
	(1.20)		(0.22)	(0.04)	(0.04)	(0.02)	(0.15)
KN2-3	101.82	ND	93.20	0.53	0.43	0.18	0.89
	(0.34)		(0.37)	(0.43)	(0.14)	(0.06)	(0.11)
KV2-5	44.20	ND	61.56	0.56	0.48	0.19	0.62
	(0.20)		(0.25)	(0.01)	(0.01)	(0.00)	(0.03)
KV2-4	119.94	ND	192.69	0.17	0.13	0.11	0.18
	(48.74)		(23.01)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.01)
Staphylococcus							
KT2-10	0.10	0.03	0.12	0.43	0.38	0.08	0.05
	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.01)	(0.00)	(0.00)	(0.00)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว MØller ที่ 35°ซ ของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่แยกจากปลากะตักที่เน่าเสีย

Bacterial strain	Content (mg/100 ml)						
	Put	**Cad**	**Him**	**Tym**	**Spd**	**Spm**	**Trm**
Proteus	234.65	0.79	82.93	2.02	1.07	0.05	0.53
KP1-6	(1.14)	(0.13)	(0.17)	(0.08)	(0.04)	(0.01)	(0.02)
Enterobacter							
KN2-16	245.61	108.78	136.58	0.53	0.44	0.03	0.45
	(0.26)	(0.39)	(0.70)	(0.01)	(0.04)	(0.00)	(0.00)
KN2-20	233.21	104.63	92.02	2.76	2.40	0.04	0.63
	(0.64)	(0.55)	(0.48)	(0.07)	(0.04)	(0.01)	(0.25)
Morganella							
KP2-12	244.76	5.13	147.89	3.04	2.28	0.05	0.41
	(0.37)	(0.48)	(0.48)	(0.43)	(0.39)	(0.00)	(0.09)
KN2-3	234.76	5.93	91.87	4.01	3.01	0.04	0.04
	(1.87)	(0.24)	(1.71)	(0.01)	(0.01)	(0.00)	(0.00)
KV2-5	238.83	5.74	87.69	3.74	2.72	0.05	0.38
	(0.41)	(0.21)	(0.31)	(0.05)	(0.04)	(0.00)	(0.18)
KV2-4	241.35	5.18	159.79	2.83	2.11	0.04	0.19
	(1.78)	(0.48)	(2.37)	(0.30)	(0.27)	(0.00)	(0.25)
Staphylococcus							
KT2-10	209.44	156.52	103.40	3.42	3.32	0.11	1.54
	(1.21)	(1.49)	(0.79)	(0.40)	(0.38)	(0.01)	(0.21)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อาหารเหลวของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีแนวโน้มสูงกว่าการทดสอบในตัวอย่างปลา (รูปที่ 5c-11c) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่ 35°C และการทดสอบในอาหารเหลวมีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 10^9 cfu/ml ซึ่งสูงกว่าการทดสอบที่ใช้ปลาเป็นตัวอย่าง ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10^6 cfu/g ความสามารถในการสร้างไทรามีนของ *Staphylococcus xylosus* ในอาหารเหลวอาจถูกจำกัด เนื่องจากไทโรซีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไทรามีนมีความสามารถในการละลายที่ต่ำในอาหารเหลว ในขณะที่การทดสอบโดยใช้ปลากะตัก แบคทีเรียสามารถย่อยโปรตีนจากปลาโดยใช้เอนไซม์โปรติเนสซึ่งย่อมทำให้มีปริมาณไทโรซีนที่เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันเป็นไทรามีนได้

Morganella morganii สามารถสร้างพิวเทรสซีนและฮีสตามีนได้สูง แต่สร้างคาดาเวอรีนได้ต่ำที่ 35°ซ (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบในระบบปลากะตัก (รูปที่ 5c,7c) เป็นที่น่าสังเกตว่า *Morganella morganii* มีแนวโน้มที่จะสร้างพิวเทรสซีนได้สูงกว่าฮีสตามีนเมื่อทดสอบในอาหารเหลว ส่วน *Enterobacter aerogenes* สามารถสร้างทั้งพิวเทรสซีน ฮีสตามีน และคาดาเวอรีนได้สูงในอาหารเหลว (ตารางที่ 5) ในขณะที่ความสามารถในการสร้างพิวเทรสซีนได้น้อยกว่าฮีสตามีนและคาดาเวอรีนในตัวอย่างปลากะตัก (รูปที่ 5c-7c) เนื่องจากการทดสอบในปลากะตักได้เติมปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่าในการทดสอบในอาหารเหลวดังที่กล่าวข้างต้น (รูปที่ 4) ประกอบกับปริมาณออนิธีน (ornithine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของพิวเทรสซีน อาจมีจำกัดในตัวอย่างปลากะตัก เนื่องจากในธรรมชาติ ออนิธีนเป็นผลิตผลที่เกิดจากการย่อยสลายของกรดอะมิโนอาร์จินีน ในขณะที่ในอาหารเหลวนั้นมีการเติมออนิธีนซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นของพิวเทรสซีนได้ทันที ดังนั้นจึงเกิดพิวเทรสซีนในอาหารเหลวมากกว่าในปลากะตัก แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษานี้ สามารถสร้างไทรามีน สเปอมีน สเปอมิดีน และทริพทามีนในอาหารเหลวได้ค่อนข้างน้อย

จากผลการศึกษานี้เห็นได้ว่า ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียในอาหารเหลว MØller อาจไม่สอดคล้องกับการทดสอบที่ใช้เนื้อปลาเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารตั้งต้น และองค์ประกอบของสารอาหารอื่น ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การใช้อาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของเนื้อปลาเช่น fish broth อาจแสดงถึงความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียได้ใกล้เคียงกับสิ่งที่จะเกิดขึ้นจริงในปลา เนื่องจากอย่างน้อยที่สุดองค์ประกอบของ fish broth จะใกล้เคียงกับองค์ประกอบในปลามากกว่าในอาหารเหลว MØller

จะเห็นได้ว่าการเน่าเสียของปลากะตักไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนเท่านั้น แต่ส่งผลให้เกิดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นด้วย *Morganella morganii, Proteus vulgaris* และ

Enterobacter aerogenes เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงในปลากะตัก ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนที่ 15 และ 35°ซ ของทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน คาดาเวอรีนเป็นไบโอจีนิกที่เกิดการสะสมเมื่อปลากะตักเกิดการเน่าเสียที่ 15 และ 35°ซ โดย *Enterobacter aerogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้ปลากะตักมีปริมาณคาดาเวอรีนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พิวเทรสซีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบในปลากะตักที่เน่าเสียทั้งที่ 15 และ 35°ซ โดยเกิดจาก *Proteus vulgaris* และ *Morganella morganii* ส่วน *Enterobacter aerogenes* และ *Staphylococcus xylosus* เป็นแบคทีเรียที่มีผลต่อการสร้างไทรามีนในปลากะตักที่เน่าเสียที่ 15 และ 35°ซ โดยไทรามีนเกิดการสะสมที่ 15°ซ สูงกว่าที่ 35°ซ ส่วนการสะสมของทริพทามีนเกิดจาก *Morganella morganii* และ *Proteus vulgaris* เป็นสำคัญ

การทดลองที่ 3 การแยกและระบุชนิดจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในปลาสร้อย

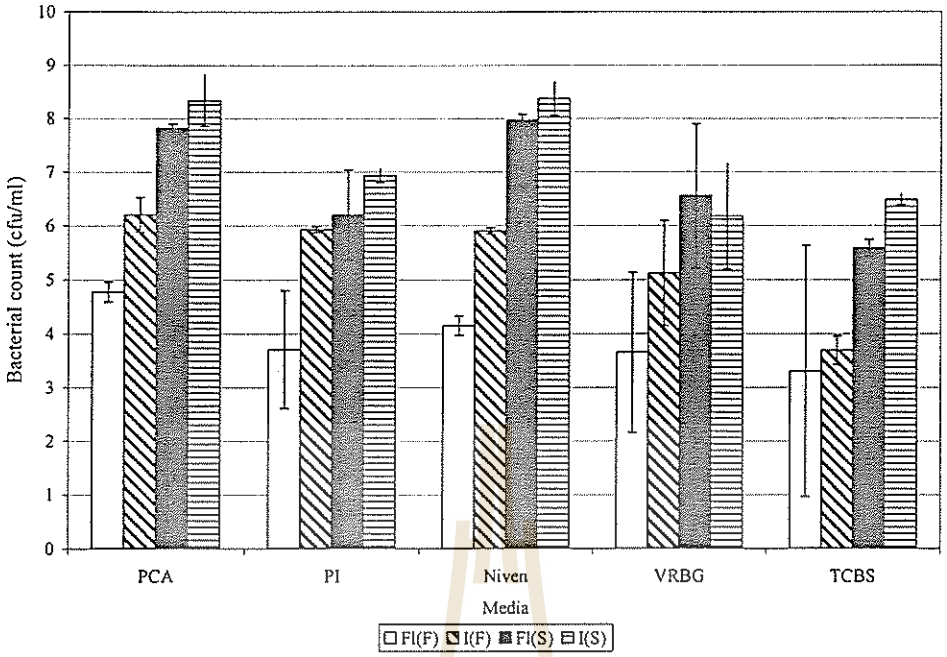
3.1 คุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่เริ่มเน่าเสีย

การเก็บปลาสร้อยที่ 35°ซ นาน 20 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเน่าเสีย ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มค่า TMA, TVB-N และ pH (ตารางที่ 6) ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจาก 0.024 มิลลิกรัม/100 กรัม ในปลาสด เป็น 5.5 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อเก็บตัวอย่างที่ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (ตารางที่ 6) การเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลาสร้อยเกิดขึ้นน้อยกว่าในปลากะตักเมื่อเทียบที่ระดับการเน่าเสีย (ค่า TMA และ TVB-N) ที่ใกล้เคียงกัน (Rodtong et al., 2005) ทั้งนี้เนื่องจาก ปริมาณฮีสติดีนอิสระในปลาสร้อยอาจมีน้อยกว่าในปลากะตัก จึงทำให้การเกิดดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของฮีสติดีนเกิดเกิดขึ้นน้อยกว่า

ตารางที่ 6 คุณภาพทางเคมีของปลาสร้อยที่สภาวะความสดต่างๆ

Incubation time at 35°C (h)	Histamine (mg/100 g)	pH	Trimethylamine (mg TMA/100g)	Total volatile base-nitrogen (mg N/100g)
0	0.024±0.007	6.88±0.12	1.22±0.21	16.81±0.40
20	5.5±1.07	7.40±0.17	160.23±26.67	375.05±98.18

Mean±standard deviation from 2 different lots of fish. Measurement was done in duplicate in each lot.



รูปที่ 12 จำนวนจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่เน่าเสีย **FI(F) = Fresh flesh (เนื้อปลาสด) , I(F) = Fresh intestine (ไส้จากปลาสด), FI(S) = Spoiled flesh (เนื้อปลาที่เน่าเสีย), I(S) = Spoiled intestine (ไส้จากปลาที่เน่าเสีย)**

ลำไส้ของปลาสดมีปริมาณจุลินทรีย์สูงกว่าในเนื้อปลาสด (รูปที่ 12) เนื่องจากเป็นอวัยวะในการย่อยและลำเลียงอาหารของปลา จึงเป็นแหล่งของ microflora เมื่อบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมงเพื่อทำให้เกิดการเน่าเสีย จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นทั้งในส่วนของเนื้อปลาและส่วนของลำไส้ปลา สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ที่เน่าเสียเมื่อใช้อาหาร Niven นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม pseudomonads, *Enterobacteriaceae* และ แบคทีเรียที่สามารถเจริญบน TCBS agar เพิ่มขึ้นทั้งในส่วนของเนื้อและส่วนของลำไส้ที่เน่าเสีย Rodtong et al. (2005) พบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ในตัวอย่างปลากะตักที่เน่าเสีย ที่ 35°C เช่นกัน

3.2 การแยกคัดเลือกและระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนในปลาสร้อย

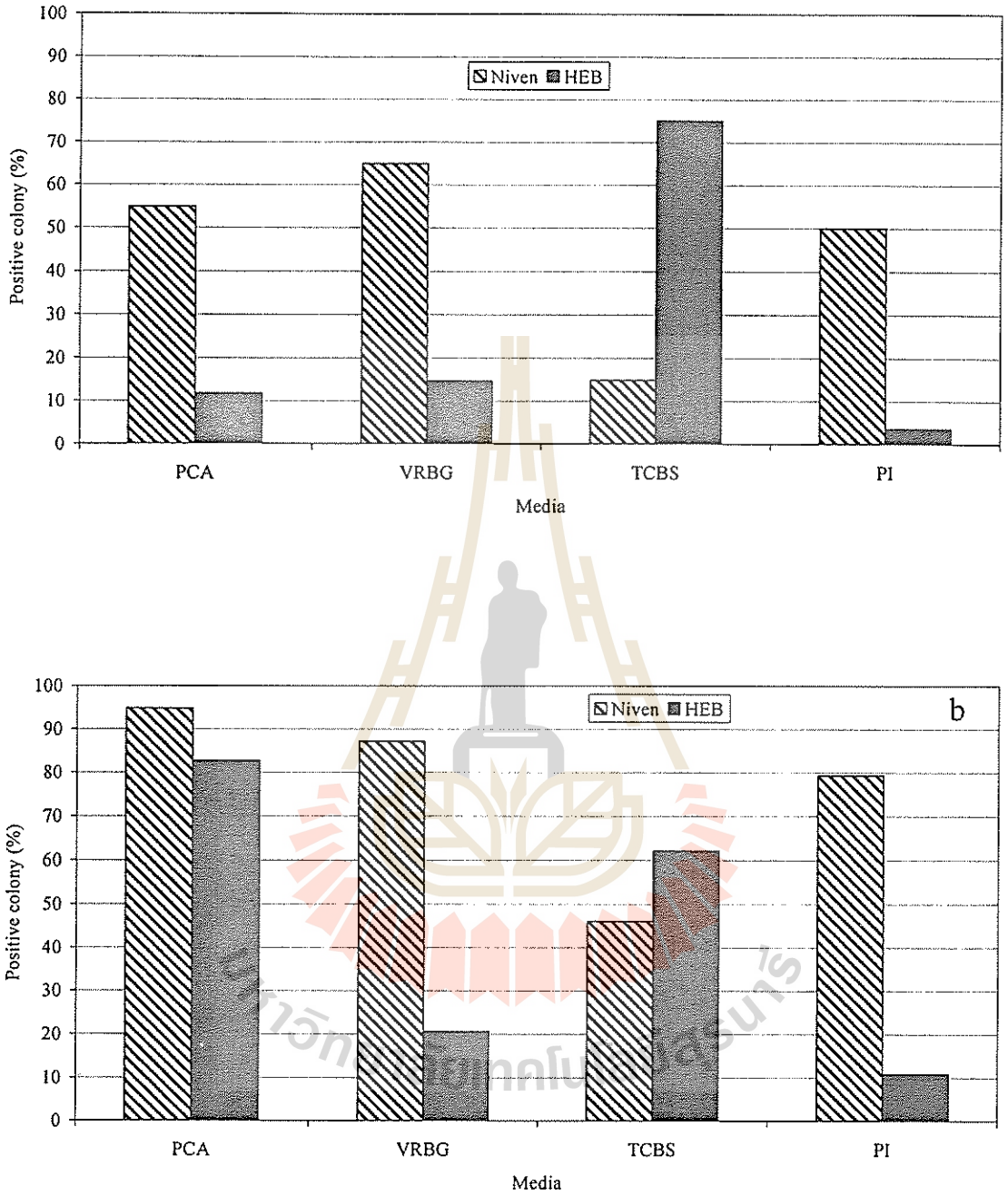
ในการศึกษานี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่ใช้แยกเชื้อ (PCA, PI, Niven, VRBG และ TCBS) จากตัวอย่างปลาสดและปลาที่เน่าเสีย 2 ซ้ำ (replication) ได้

ตารางที่ 7 จำนวนไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากตัวอย่างปลาสร้อยสดและปลาที่เน่าเสีย

Media	Number of isolates	
	Fresh sample	Spoiled sample
PCA	62	116
PI	56	58
VRBG	74	39
TCBS	27	63
Total	219	276

ทั้งสิ้น 495 ไอโซเลท (ตารางที่ 7) โดยสามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากอาหาร PCA ได้จำนวนสูงสุดคือ 178 ไอโซเลท ทั้งจากในส่วนของลำไส้และเนื้อปลา เมื่อนำไอโซเลทเหล่านี้ไปทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven พบว่าไอโซเลทที่คัดแยกจาก PCA, PI และ VRBG จากตัวอย่างปลาสดให้ผลบวกประมาณ 50-65% (รูปที่ 13a) และจากตัวอย่างที่เน่าเสียนั้นให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven ประมาณ 80-95% (รูปที่ 13b) ส่วนไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven เพียง 15 และ 40% จากตัวอย่างปลาสดและตัวอย่างที่เน่าเสีย ตามลำดับ (รูปที่ 13a,b) อย่างไรก็ตามเมื่อนำไอโซเลทที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven ไปทดสอบการสร้างฮีสตามีนในอาหารเหลวHEB โดยกำหนดให้ไอโซเลท ที่สามารถสร้างฮีสตามีนใน HEB ได้มากกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร เป็นไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีน ซึ่งพบว่าจำนวนไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างสด (ปลาและลำไส้) สามารถสร้างฮีสตามีนในอาหาร HEB ในสัดส่วนน้อยมาก (รูปที่ 13a) จากจำนวนไอโซเลททั้งหมด 219 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาสร้อยสด (ตารางที่ 7) มีเพียง 15 ไอโซเลท เท่านั้นที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้มากกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ใน HEB แสดงให้เห็นว่า microflora ในตัวอย่างปลาสดมีสัดส่วนของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนน้อยมาก (≈6.8%)

ส่วนในตัวอย่างปลาสร้อยที่เกิดการเน่าเสียนั้น ไอโซเลทที่แยกจากอาหาร PCA มีสัดส่วนของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนสูงเมื่อเทียบกับจำนวนไอโซเลทที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น (รูปที่ 13b) อาหาร VRBG และ PI สามารถแยกไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนได้ค่อนข้างน้อย จากแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 276 ไอโซเลทจากตัวอย่างที่เกิดการเน่าเสีย สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถสร้าง



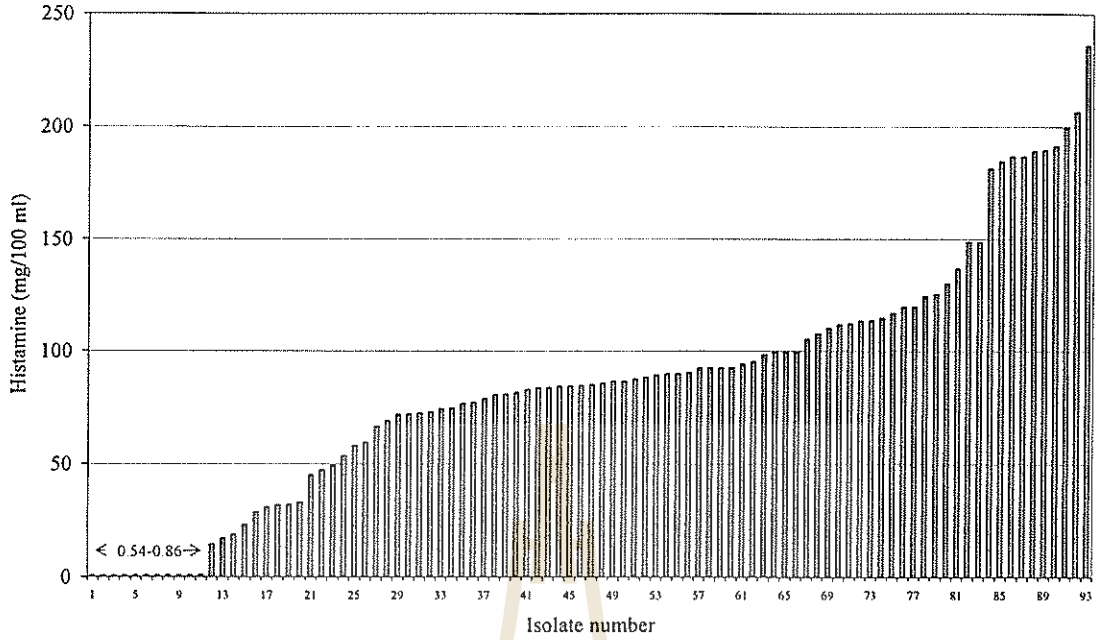
รูปที่ 13 ผลบวกจากการทดสอบโดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven และ Histamine evaluation broth (HEB) ของไอโซเลทที่คัดแยกได้จากปลาสร้อยสด (a) และปลาสร้อยที่เน่าเสีย (b) จากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

ฮีสตามีนได้ 121 ไอโซเลท คิดเป็น 43.8% ซึ่งเป็นสัดส่วนที่สูงกว่าในตัวอย่างสด (≈6.8%) ดังนั้น จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนมีโอกาสพบได้มากกว่าในปลาสร้อยที่เน่าเสีย

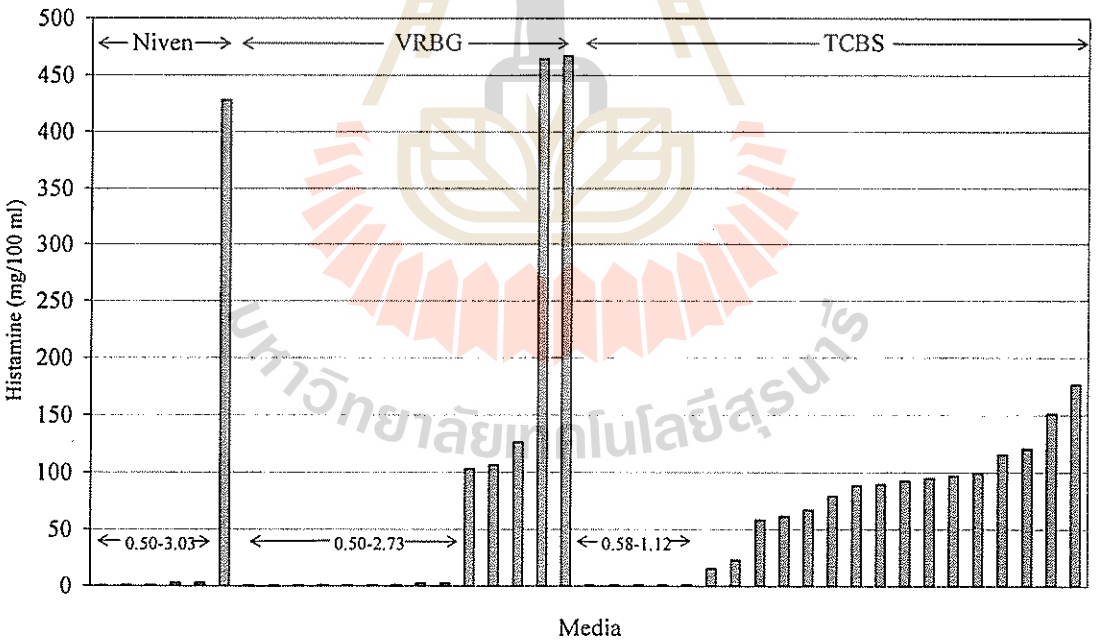
ในภาพรวม อาหาร Niven ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั้งแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างฮีสตามีน ให้ผลบวกที่ผิดพลาด (false positive) ค่อนข้างสูงเมื่อนำมาทดสอบเพื่อยืนยันผล แต่ไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหาร TCBS จะให้ผลบวกที่ผิดพลาดน้อยกว่าอาหารชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม จำนวนไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหาร TCBS และให้ผลบวกบน Niven มีจำนวนน้อย กล่าวคือจากจำนวนทั้งหมด 90 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จาก TCBS มีเพียง 33 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven โดย 21 ไอโซเลทจาก 33 ไอโซเลทนั้น สามารถสร้างฮีสตามีนใน HEB จากผลการศึกษานี้พบว่าอาหาร PCA และ TCBS สามารถใช้เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนในปลาสร้อยที่เน่าเสีย โดยประมาณ 75% ของไอโซเลทที่คัดแยกจากอาหาร PCA ที่ให้ผลบวกบนอาหาร Niven สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการควบคุมปริมาณฮีสตามีนคือการควบคุมคุณภาพความสดของปลา เป็นที่น่าสังเกตว่าไอโซเลทที่สุ่มเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ใช้แยกและตรวจนับเชื้อเป็นไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนได้มากกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ในขณะที่ไอโซเลทจาก PI และ VRBG ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Pseudomonads และ *Enterobacteriaceae* ตามลำดับ มีแนวโน้มที่สร้างฮีสตามีนได้น้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร หรือไม่สร้างฮีสตามีนเลย

โดยทั่วไปแล้ว แบคทีเรียทุกชนิดสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PCA โอกาสที่จะได้จุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนได้สูงจึงอาจมีน้อย จึงมีการพัฒนาอาหาร Niven ซึ่งเป็น differential medium (Niven et al., 1981) อย่างไรก็ตามเป็นที่ประจักษ์แล้วว่าอาหารดังกล่าวให้ผลบวกที่ผิดพลาดค่อนข้างสูง (Ababouch et al., 1991; Ben-Gigirey et al., 1999; López-Sabater et al., 1996; Rodríguez-Jerez et al., 1994a,b; Roig-Sagués et al., 1996) ต่อมาจึงได้มีการเสนอให้ใช้ selective media เป็นการคัดเลือกก่อนการทดสอบการสร้างฮีสตามีน (Kim et al., 2001) แต่ผลการศึกษานี้กลับแสดงให้เห็นว่าการสุ่มคัดเลือกไอโซเลทจาก PCA ก็สามารถทำให้ได้ไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนได้สูงเช่นกัน

ไอโซเลทที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้มีจำนวน 95 ไอโซเลท โดยสามารถสร้างฮีสตามีนระหว่าง 0.54-236.0 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (รูปที่ 14) และมีเพียง 11 ไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนในระดับต่ำคือประมาณ 0.54-0.86 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นประมาณ 11.8% ของไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนที่แยกได้จาก PCA และมีมากถึง 69 ไอโซเลท (74.2%) ที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้มากกว่า 50 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ส่วนไอโซเลทที่แยกได้จาก VRBG 14 ไอโซเลทนั้น มีถึง 9 ไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนในช่วง 0.5-2.73 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (รูปที่ 15) ซึ่งคิดเป็น



รูปที่ 14 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนใน HEB ของไอโซเลทที่แยกได้จากอาหาร PCA



รูปที่ 15 ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนใน HEB ของไอโซเลทที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

64.3% ในขณะที่ไอโซเลทที่ผลิตฮีสตามีนได้สูงมาก (>50 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) คิดเป็น 35.7% จะเห็นได้ว่าไอโซเลทที่แยกได้จาก VRBG มีแนวโน้มเป็นไอโซเลทที่ผลิตฮีสตามีนได้น้อย ส่วนไอโซเลทที่แยกได้จากอาหาร TCBS ทั้งหมด 12 ไอโซเลทนั้น จัดเป็นไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนได้น้อย (0.58-1.1 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) 5 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 41.7% ส่วนที่เหลือ (58.3%) เป็นไอโซเลท ที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงมาก (>50 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) (รูปที่ 15) นอกจากนี้ไอโซเลทที่แยกและคัดเลือกจากอาหาร Niven ซึ่งเป็นอาหารที่นิยมใช้เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนนั้น โดยส่วนใหญ่ (83%) สร้างฮีสตามีนได้ต่ำ (0.50-3.04 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) (รูปที่ 15) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Kim et al. (2001) ที่รายงานว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Niven เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนได้ต่ำ ไอโซเลทที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PI ทั้ง 3 ไอโซเลทจัดเป็นไอโซเลทที่สร้างฮีสตามีนได้น้อยคือ 1.03-1.23 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (รูปที่ 15) แม้ว่าการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนแบบ 2 ขั้นตอน โดยคัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ก่อนนำไปทดสอบในอาหารแข็ง Niven ตามด้วยทดสอบการสร้างฮีสตามีนในอาหารเหลว HEB จะเป็นการคัดเลือกที่มีหลายขั้นตอนและใช้เวลามาก แต่ก็เป็นวิธีการที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกโดยใช้อาหารแข็ง Niven ชนิดเดียว และจากการศึกษานี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ซึ่งจุลินทรีย์ทุกชนิดสามารถเจริญได้กลับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการคัดแยก แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจากปลาสร้อยโดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับ VRBG, PI และ TCBS

จากผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียในปลาสร้อย พบว่า *Plesiomonas shigelloides* เป็นกลุ่มแบคทีเรียหลักที่สร้างฮีสตามีน (ตารางที่ 8) โดย *Plesiomonas shigelloides* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้ของปลาสร้อยเนื่องจากสามารถแยกได้จากส่วนของไส้ปลาสร้อยสด การบ่มปลาสดที่ 35°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมงทำให้ *Plesiomonas* ในลำไส้เจริญเติบโตและมีส่วนก่อให้เกิดการเน่าเสียของปลา และเนื่องจาก *Plesiomonas shigelloides* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นที่พบในปลาสร้อยที่เน่าเสีย จึงสามารถคัดแยกแบคทีเรียนี้จากอาหาร PCA เป็นที่น่าสังเกตว่าความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของ *Plesiomonas shigelloides* นั้นแตกต่างกันค่อนข้างสูงระหว่างไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่า *Morganella morganii, Klebsiella oxytoca* และ *Serratia fonticula* ที่คัดแยกจากปลาสร้อยเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงเช่นกัน จากผลการศึกษานี้พบว่าจุลินทรีย์ที่สร้างฮีสตามีนได้สูงเหล่านี้ส่วนใหญ่มาจากส่วนของลำไส้ปลา ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการลดการปนเปื้อนคือการกำจัดไส้ออกจากตัวปลาในขณะที่ยังคงสภาพสด Lopez-Sabater et al. (1996) คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนจากปลาทูน่า ปลา bonito และ ปลา mackerel และพบว่าแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้แก่ *Plesiomonas shigelloides,*

Enterobacter intermedium, Serratia marcescens, Serratia plymuthica และ *Serratia fonticula* โดยสร้างฮิสตามีนในช่วง 0.8-34.0 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ส่วน *Morganella morganii* เป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงในปลาทูน่า (albacore) ซึ่งให้ค่าฮิสตามีนสูงถึง 525.3 มิลลิกรัม/100 กรัม (Kim et al., 2000; Kim et al., 2001; Kim et al., 2002) และในปลากะตัก (Rodtong et al., 2005) จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบแบคทีเรียในปลาสร้อยคือ *Aeromonas hydrophila*, *Sphingomonas paucimobilis* และ *Providencia* spp. แต่แบคทีเรียเหล่านี้สร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณน้อย ซึ่งอาจไม่มีบทบาทต่อการเพิ่มปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในปลาสร้อยมากนัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 8 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาสร้อย

Bacteria	Medium	Source[1]	Number of isolates	Histamine produced (mg/100 mL)
Plesiomonas shigelloides	PCA	I(S)	26	91.4[2] (14.4-189.0)[3]
		Fl(S)	9	91.2 (32.8-191.3)
	Niven	I(S)	6	122.9 (77.9-191.3)
	TCBS	I(S)	4	121.7 (92.5-176.6)
	VRBG	I(F)	1	126.4
Morganella morganii	PCA	I(S)	1	236.0
	PI	Fl(S)	1	222.6
Klebsiella oxytoca	Niven	Fl(S)	1	428.0
Serratia fonticula	VRBG	I(S)	1	464.1
Serratia liquefaciens	PCA	Fl(S)	1	0.80
Aeromonas hydrophila	PCA	I(F)	2	0.70 (0.53-0.86)
		Fl(S)	3	0.49 (0.04-0.73)
	Niven	Fl(S)	1	0.50
	PI	Fl(S)	3	0.92 (0.48-1.23)
	TCBS	Fl(S)	1	0.77
Enterobacter cloacae	PCA	I(S)	1	0.99
		Fl(S)	1	0.60
	Niven	Fl(S)	1	2.8
	VRBG	I(S)	2	0.81 (0.73-0.89)
Enterobacter aerogenes	Niven	Fl(S)	1	0.79
Citrobacter freundii	PCA	Fl(S)	1	0.84
	Niven	Fl(S)	1	3.0
Chryseobacterium sp.	PCA	I(S)	1	0.87
Chryseobacterium luteola	VRBG	I(S)	1	466.9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 8 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาสร้อย (ต่อ)

Bacteria	Medium	Source[1]	Number of isolates	Histamine produced (mg/100 mL)
Klebsiella pneumoniae	PCA	Fl(S)	1	0.72
Subsp. *pneumoniae*	VRBG	I(S)	1	0.52
Klensiella pneumoniae	VRBG	Fl(S)	1	2.73
Subsp. *ozaenae*				
Sphingomonas paucimobilis	PCA	Fl(F)	1	148.7
Providencia alcalifaciens	PI	I(F)	1	0.10
		Fl(S)	1	0.92
Providencia rettgeri	TCBS	Fl(S)	1	0.58
Staphylococcus hominis	TCBS	Fl(S)	1	0.90
Staphylococcus sciuri	PCA	Fl(S)	1	0.54
Staphylococcus xylosus	PCA	I(S)	1	113.6
		Total	81	

[1] I = intestines, Fl = Flesh, (S) = spoiled sample, (F) = fresh sample

[2] Duplication was carried out in each isolate. Mean values of all isolates were presented

[3] Range of histamine produced by various isolates

3.3 ความสามารถในการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียในอาหารเหลว MØller จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Plesiomonas shigelloides, Morganella morganii, Klebsiella oxytoca, Serratia fonticula* และ *Aeromonas hydrophila* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ เจริญในอาหารเหลว MØller ได้ใกล้เคียงกัน คือ $2.8\text{-}9.7\times10^{9}$ cfu/ml เมื่อเลี้ยงได้ 18 ชั่วโมง และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไบโอจินิกเอมีน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สร้างสเปอมีนและไทรามีนได้น้อย (<1 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ในอาหาร MØller ความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของ *Plesiomonas shigelloides* แตกต่างกันในแต่ละไอ-โซเลท (ตารางที่ 9) ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับตารางที่ 8 ซึ่งวิเคราะห์โดย spectrofluorometer แต่ความสามารถในการสร้างคาดาเวอรีนและพิวเทรสซีนของ *Plesiomonas shigelloides* นั้นใกล้เคียงกัน

ใน 5 ไอโซเลทที่เลือกมาศึกษา ปริมาณคาดาเวอรีนและพิวเทรสซีนที่สร้างโดย *Plesiomonas shigelloides* ที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยนี้จัดว่าสูงมาก และมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าฮีสตามีน (ตารางที่ 9) ซึ่งปริมาณที่สูงดังกล่าวอาจมีผลเพิ่มความเป็นพิษของฮีสตามีน *Plesiomonas shigelloides* สามารถสร้างทริพทามีนได้น้อย *Plesiomonas shigelloides* ที่คัดแยกได้จากปลาสร้อย สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด คือ คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และฮีสตามีน ได้สูง ส่วน *Morganella morganii* สร้างฮีสตามีนและพิวทรีซีนได้สูงคือ 170.3 และ 212.6 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถสร้างคาดาเวอรีนและสเปอมิดีนได้น้อย (ตารางที่ 9) และเมื่อเปรียบเทียบกับ *Morganella morganii* ที่คัดแยกได้จากปลาทะเลที่เน่าเสีย พบว่าความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนมีแนวโน้มเหมือนกัน

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของไบโอจีนิกเอมีนที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกจากปลาสร้อยที่เน่าเสีย

Bacterial strain	No. of isolate tested	Biogenic amine content (mg/100 ml)				
		Him	Cad	Put	Spd	Tym
Plesiomonas	5	43.9 (33.9) (*12.7 – 114.9*)	203.5 (16.8) (*186.9 – 246.0*)	228.4 (14.2) (*212.3 – 261.2*)	ND	1.7 (2.6)
Morganella	1	170.3 (47.4)	7.7 (1.2)	212.6 (8.5)	2.0 (2.8)	ND
Klebsiella	1	247.0 (19.8)	194.6 (9.7)	ND	ND	ND
Serratia	1	180.8 (6.7)	122.0 (2.2)	204.6 (8.1)	ND	ND
Aeromonas	1	28.7 (5.7)	62.1 (55.9)	1.8 (2.4)	ND	ND

1 = Mean values of duplicate measurement for each isolate

2=Number in ( ) indicates standard deviation

3=Number in (___) indicates range of measurement from various isolates

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คือสร้างฮีสตามีนและพิวเทรสซีนได้สูง *Klebsiella oxytoca* สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนสำคัญ 2 ชนิดคือฮีสตามีน และคาดาเวอรีนโดยมีปริมาณสูงถึง 247 และ 194.6 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Serratia fonticula* สามารถสร้างได้ทั้งฮีสตามีน คาดาเวอรีน และ พิวเทรสซีน ได้สูง ส่วน *Aeromonas hydrophila* สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ 4 สายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้น

ความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแตกต่างตามชนิดและสายพันธุ์ แม้แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่จัดอยู่ใน 4 ชนิดคือ *Plesiomonas shigelloides, Morganella morganii, Klebsiella oxytoca* และ *Serratia fonticula* จะสร้างฮีสตามีนได้สูง แต่ความสามารถในการสร้างไบโอ-จีนิกเอมีนชนิดอื่น โดยเฉพาะพิวเทรสซีนและคาดาเวอรีนซึ่งเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่สามารถเสริมความเป็นพิษของฮีสตามีนนั้นแตกต่างกัน ดังนั้นการปนเปื้อนของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด อาจก่อให้เกิดการสะสมของไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉพาะฮีสตามีน คาดาเวอรีน และพิวเทรสซีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุป

การเน่าเสียของปลากะตักไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการสะสมของฮีสตามีน แต่ยังทำให้ปริมาณคาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้น้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่มีคุณภาพความสดต่ำมีสารไบโอจีนิกเอมีน 4 ชนิดนี้สูง การเปลี่ยนแปลงของไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักที่อุณหภูมิห้องและที่ 40 °ซ เกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้นคุณภาพความสดของปลาจึงเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลา ไบโอจีนิกเอมีนสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลาได้ดีโดยสามารถสะท้อนถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ ดังนั้นจึงควรใช้ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลาร่วมกับปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด

แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนสูงที่แยกจากปลากะตักและคัดเลือกได้ มีความสามารถในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่นนอกจากฮีสตามีน ที่ 15 และ 35°ซ โดย *Enterobacter aerogenes* สร้างคาดาเวอรีนได้สูง ในขณะที่ *Morganella morganii* สร้างทั้งพิวเทรสซีนและไทรามีนได้สูง *Proteus vulgaris* สร้างพิวเทรสซีนได้สูง ส่วน *Staphylococcus xylosus* สร้างไทรามีนได้สูง การปนเปื้อนของจุลินทรีย์เหล่านี้ในปลากะตักที่เน่าเสียที่ 15 และ 35°ซ ทำให้เกิดการสะสมของฮีสตามีน คาดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน

Plesiomonas shigelloides, Morganella morganii, Klebsiella oxytoca, Aeromonas hydrophila และ *Serratia fonticula* เป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้สูงที่แยกได้จากปลาสร้อยที่เน่าเสีย โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน (มากกว่า 0.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ได้จำนวนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ VRBG, PI และ TCBS โดย *Plesiomonas shigelloides* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบทั้งในปลาสร้อยสดและปลาสร้อยที่เน่าเสีย *Plesiomonas shigelloides* และ *Serratia fonticula* สามารถสร้างฮีสตามีน คาดาเวอรีน และพิวเทรสซีนได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว *Klebsiella oxytoca* และ *Aeromonas hydrophila* ผลิตทั้งฮีสตามีนและคาดาเวอรีนในปริมาณสูง ส่วน *Morganella morganii* สามารถผลิตฮีสตามีนและพิวเทรสซีนได้สูง

เอกสารอ้างอิง

จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล สุรีลักษณ์ รอดทอง และปิยะวรรณ กาสลัก. 2546. ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 98 หน้า

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.

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

Ababouch, L., Afila, 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°C). Food Microbiol. 8, 127-136.

Associaton of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis, 16th Edition. AOAC International, Arlington, Virginia.

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

Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J.M., Villa, T.G., and Barros-Velazquez, J., 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). J. Food Prot. 62, 933-939.

Canadian Food Inspection Agency (CFIA). 2003. Fish Inspection Act. http://laws.justice.gc.ca/en/F-12/C.R.C.-c.802/117117.html.

www.customs.go.th

Eerola, S., Hinkkanen, R., Linfords. E., Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. J Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 76: 575-577.

Fields, R. 1971. The measurement of amino groups in proteins and peptides. Biochem. J. 124: 581-590.

Fish Inspection and Quality Control Division (FIQD). 2000. Quality Reference Criteria of Fish and Fisheries Prodcuts. Bangkok: Department of Fisheries. 13 p.

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.

Gildberg, A., Thongthai, C. 2001. The effect of reduced salt content and addition of halophilic lactic acid bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat. J Aqua. Food Prod. 10: 77-88.

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

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

Kim S.H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velázquez, J., Price, R.J., An, H. 2000. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. J. Food Prot. 63: 244-251.

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., An, H. 2002. Histamine production by Morganella morganii in mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at varius storage temperature. J Food Sci. 67: 1522-1528.

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

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

Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., Nychas, G.F.E. 1999. Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15°C. J. Food Prot. 62: 398-402.

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

López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., Hernández-Herrero, M., Roig-sagués, A.X. , and Mora-Ventura, M.T., 1996. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). J. Food Prot. 59, 167-174.

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

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

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

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

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.

Rodríguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., López-Sabater, E.I., Hernández-Herrero, M., 1994a. Histidine, lysine, and ornithine decarboxylase bacteria in Spanish salted semi-preserved anchovies. J. Food Prot. 57, 784-787, 791.

Rodríguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., López-Sabater, E.I., and Hernández-Herrero, M., 1994b. Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies. J. Food Sci. 59, 998-1001.

Rodtong, S., Nawong, S., Yongsawatdigul, J. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiol. In press.

Roig-Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., and Mora-Ventura, M.T., 1996. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salchichón, a Spanish cured sausage. J. Food Prot. 59, 516-520.

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

Saisithi, P. 1994. Traditional fermented fish: fish sauce production. In AM Martin, editor. Fisheries Processing Biotechnological Application. London: Chapman & Hall. P. 111-131.

Sanceda, N., Suzuki, E., Ohashi, M., Kurata, T. 1999. Histamine behavior during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. J. Agric. Food Chem. 47: 3596-3600.

Siringan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2004. Proteinase activity and autolytic activity of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Poster presentation. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

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.

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

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

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

Vo-Van, T., Kusakabe, I., Murakami, K. 1984. The aminopeptidase in fish sauce. Agric. Biol. Chem. 48: 525-527.

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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

EDUCATION

Ph.D., Food Science and Technology, Oregon State University, USA, 1996.
M.S., Food Science, University of Wisconsin-Madison, Madison, USA, 1992.
B.S. (Honor), Food Technology, Chulalongkorn University,
Thailand, 1989.

EXPERIENCE

June 1999-Present **ASSISTANT PROFESSOR**
School of Food Technology
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

May 1997-June 1999 **LECTURER**
School of Food Technology
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Feb. 1996-May 1997 **RESEARCH ASSOCIATE**
Department of Food Science and Technology
Seafood Laboratory
Oregon State University
Astoria, OR. USA.

Sept. 1992-Jan 1996 **GRADUATE RESEARCH ASSISTANT**
Department of Food Science and Technology
Oregon State University
Corvallis, OR, USA.

Sept. 1991-May 1992 **GRADUATE RESEARCH ASSISTANT**
Department of Food Science
Univeristy of Wisconsin-Madison
Madison, WI, USA.

1988-1990 **PRODUCTION SUPERVISOR**
Leamthong Flour Mill Co.
Samutprakarn, Thailand

HORNORS AND AWARDS

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

FUNDED RESEARCH GRANTS

1. **Factors affecting histamine in fish sauce fermentation**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (1999-2001).
   Funding: 600,000 Baht

2. **Proteinases and transglutaminase activity in freshwater fish species**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (2000-2001).
   Funding: 500,000 Baht

3. **Reduction of biogenic amines content during fish sauce fermentation**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (2001-2002).
   Funding: 500,000 Baht

4. **Influence of freshness quality and actomyosin denaturation on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) muscle proteins**
   Funded by Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand (1999-2000).
   Funding: 400,000 Baht

5. **Purification and characterization of transglutaminase from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**
   Funded by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand (2001-2002).
   Funding: 450,000 Baht

6. **Covalent cross-linking of threadfin bream muscle proteins by transglutaminase(s)**
   Funded by Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand (2001-2003).

Funding: 1,080,000 Baht

7. **Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi**
   Funded by Internation Foundation for Science, Sweden (2002-2003).
   Funding: US$11,000

8. **Process development of fishball and fish sausage from freshwater fish species**
   Funded by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand (2002-2004).
   Funding: 750,000 Baht

9. **Biogenic amine formation in anchovies and fermented fish products**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (2003-2005)
   Funding: 990,000 Baht

10. **Acceleration of fish sauce production using starter cultures and proteinases**
    Funded by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand (2003-2005)
    Funding: 1,872,000 Baht

11. **Study in catalytic reaction of transglutaminase in threadfin bream surimi using MALDI-TOF**
    Funded by Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand, in collaboration with Peter Sporns, Ph.D. of University of Alberta, Edmonton, Canada. (Scholarship provided to a prospective Ph.D. student to work with me and Dr. Sporns) (2002-2005).

12. **Conformation changes of muscle proteins from tropical fish species.**
    Funded by Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand, in collaboration with Eunice Li-Chan, Ph.D. of University of British Columbia, Vancouver, Canada. (Scholarship provided to a prospective Ph.D. student to work with me and Dr. Li-Chan) (2003-2006).

13. **Flavor formation in fish sauce**
    Funded by Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand, in collaboration with Keith Cadwallader, Ph.D. of University of Illinoise, Urbana-Champaign (Scholarship provided to a prospective Ph.D. student to work with me and Dr. Cadwallader) (2004-2007).

SELECTED PUBLICATION

Sirighan, P., Raksakulthai, N., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Chem. In press.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Virulhakul, P., and Viratchakul, S. 2000. Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. J. Food Sci. 65: 129-133.

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.

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.

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. pp25-34.

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.

Park, J.W., Mein, T.M., and **Yongsawatdigul, J**. 1997. New developments in manufacturing of surimi and surimi seafood. Food Rev. Int. 13(4): 577-610

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.

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.

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.

Book chapters

Lanier, T.C., Carvajal, P., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Surimi gelation chemistry. In Surimi and Surimi Seafood (2nd Ed). J.W. Park (Ed.) CRC. Taylor &Francis, Boca Raton, Florida. Pp. 435-489.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2004. Gelation of threadfin bream surimi as affected by thermal denaturation, transglutaminase, and proteinase(s) activities. In More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products. M. Sakaguchi (Ed.) Elsevier, Oxford, UK.

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.

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.

Yongsawatdigul, J. 1998. Ohmic heating of surimi seafood. In *Advanced Technology in Surimi Seafood Manufacturing Workshop Manual*. August 18-20, 1998. Bangkok Thailand.

Scientific Presentation

International Meeting

Sirighan, P., Raksakulthai, N., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Biochemical characteristics of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) Poster presentation. Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, June 15-20, 2005, New Orleans, USA.

Yongsawatdigul, J., Hemung, B., Sinsuwan, S. 2005. Ca^{2+}-induced conformational changes of fish muscle proteins during setting. Oral presentation. Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, June 15-20, 2005, New Orleans, USA.

McGill, J., **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., Hunt, A.L. 2004. Quantitative analysis of myofibrillar proteins in commercial surimi seafood. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2004, Las Vegas, USA.

Park, J.W., Choi, Y.J., **Yongsawatdigul, J.**, Kim, Y.S., Thawornchinsombut, S. 2004. Biochemical and functional properties of isolated fish proteins from Pacific whiting and rockfish using pH shifts. **Symposium.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2004, Las Vegas, USA.

Yongsawatdigul, J., Piyathamviboon, P., Worratao, A. 2003. Effect of protteinase inhibitors and microbial tranglutaminase on gelation of lizardfish surimi. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2003, Chicago, USA.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., Choi, Y.J., Udomporn, S. 2003. Changes of biogenic amines during fish sauce fermentation. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2003, Chicago, USA.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2003. Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Poster presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2003, Chicago, USA.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2002. Biochemical characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Oral presentation.** 7th International Conference on Transglutaminase and Protein Cross-linking Reaction, September 14-17, 2002, Ferrara, Italy.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2001. Biochemical changes of threadfin bream during ice storage and their effect on thermal denatruation pattern. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, June 23-27, 2001. New Orleans, USA.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2001. Gelation characteristics of alkaline and acid solubilization of fish mucle proteins. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, June 23-27, 2001. , New Orleans, USA.

Yongsawatdigul, J., Kim, Y.S., and Park, J.W. 2001. Biochemical and gelation properties of acid- and alkaline-aided solubilization of fish muscle proteins. **Oral presentation.** International Symposium on More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products, October 7-10, 2001, Kyoto, Japan

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2001. Gelation of threadfin bream surimi as affected by thermal denaturation, transglutaminase, and proteinase(s) activities. **Oral presentation.** International Symposium on More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products, October 7-10, 2001, Kyoto, Japan

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2001. Actomyosin cross-linking induced by crude transglutaminase. **Poster presentation**. International Symposium on More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products, October 7-10, 2001, Kyoto, Japan

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Virulhakul, P., and Viratchakul, S. 1999. Proteolytic degradation in tropical tilapia surimi. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 24-28, 1999, Chicago, USA.

Klesk, K., **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., Viratchakul, S, Virulhakul, P. 1999. Functional properties of tropical tilapia surimi compared with Alaska Pollock and Pacific whiting surimi. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 24-28, 1999, Chicago, USA.

*Name of presenter is underlined

Meeting held in Thailand

Nawong, S., Rodtong, S., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Selection of proteinase-producing bacteria from fish sauce fermentation process. **Poster presentation**. The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok.

Singchan, K., Piyadhammaviboon, P., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Effect of washing on gel-forming ability of small scale mud carp (*Cirrhina microlepis*) mince. **Poster presentation**. The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok.

Udomsil, N., Udomporn, S., Rodtong, S., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Biogenic amine formation in anchovies and salted fish products. **Poster presentation**. The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok. (***Won the second place of poster presentation***)

Piyadhammaviboon, P., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Biochemical characteristics of transglutaminase from threadfin bream washed water. **Poster presentation**. The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok. (***Won the third place of poster presentation***)

Sinsuwan, S., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Calcium induces conformational changes in tilapia actomyosin. **Poster presentation**. The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok.

Sirigan, P., Raksakulthai, N., **Yongsawatdigul, J.** 2005. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus* spp). The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok.

Chomnawang, C., Nantachai, K., **Yongsawatdigul, J.,** Tungkawachara, S., Thawornchinsombat. **Poster presentation**. The 7th Agro-industrial conference, June 22-24, 2005, Bangkok.

Siringan, P., Raksakulthai, N., **Yongsawatdigul, J.** 2004. Biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian Anchovy (*Stolephorus indicus*) **Oral presentation.** The 4th National Symposium on Graduate Research, Aug 10-11, 2004, Chiang Mai, Thailand.

Nawong, S., **Yongsawatdigul, J.,** and Rodtong, S. 2004. Histamine-forming bacteria from Jullien's mud carp (*Cirrhina jullieni*) **Oral presentation.** The 4th National Symposium on Graduate Research, Aug 10-11, 2004, Chiang Mai, Thailand.

Siringan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2004. Proteinase activity and autolytic activity of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Poster presentation**. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

Phetploy, J. and **Yongsawatdigul, J.** 2004. Physico-chemical changes of actomyosin from some freshwater fish during frozen storage. **Poster presentation**. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

Phunphiphud, V. and **Yongsawatdigul, J.** 2004. Total omega-3 fatty acids, iodine content, and emulsifying properties of freshwater fish species. **Poster presentation**. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand. (***Won the second place of poster presentation***)

Piyadhammaviboon, P., **Yongsawatdigul, J.**, and Worratao, A. 2003. Effect of egg white, whey protein concentrate, and microbial transglutaminase on lizardfish surimi gel. Oral presentation. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Oct 20-22, 2003. Khon Kean Univerisity.

Nawong, S., **Yongsawatdigul, J.,** and Rodtong, S. 2003. Isolation and identification of histamine forming bacteria from anchovy. **Poster presentation**. The 5th Agro-industry Annual Meeting, May 31-June 1, 2003. Bangkok, Thailand. ***(Won the third place of poster presentation)***

Yongsawatdigul, J. and Worratao, A. 2002. Role of endogenous transglutaminase on gelation of fish proteins. **Oral presentation.** The 4th Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2002. Bangkok, Thailand.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2002. Autolytic activities of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and rohu (*Labeo rohital*) **Oral presentation.** The 4th Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2002. Bangkok, Thailand.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2002. Gelation protperties of lizardfish surimi induced by microbial tramsglutaminase. **Poster presentation.** The 28th Congress on Science and Technology, Bangkok, Thailand.

Yongsawatdigul, J., Worratao, A., Park, J. 2001. Proteolytic and transglutaminase activities in threadfin bream surimi. **Oral presentation.** The 3rd Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2001. Bangkok, Thailand.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2001. Cross-linking of actomyosin induced by crude tilapia transglutaminase. **Oral presentation.** The 3rd Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2001. Bangkok, Thailand.

*Name of presenter is underlined

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

1) ชื่อ นางสาวสุรีลักษณ์ รอดทอง

MISS SUREELAK RODTONG

2) เลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 2405 00237 47 9

3) ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4) หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224297, 224633 โทรสาร (044) 224185, 224633

E-mail sureelak@ccs.sut.ac.th

5) ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2524	ตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2527	โท	วท.ม.	จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2533	Postgraduate diploma (With Credit)	PG Dipl. Sci.	Science	Biotechnology	University of Otago	New Zealand
2536	เอก	Ph.D.	Microbiology	Microbiology	University of Otago	New Zealand

6) สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียแล็กติกและเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi

7) ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ :

7.1) หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.1.1) ความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตแบซิลลัสในหญ้าหมักของไทย

7.1.2) การอยู่รอดของแลคโตแบซิลไลจากหญ้าหมักในทางเดินอาหารของโค

7.1.3) การเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม

7.1.4) การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

7.1.5) เล็กตินของเชื้อรา

7.1.6) การศึกษาอนุกรมวิธานเชิงโมเลกุลของเชื้อรากลุ่ม Xylariaceae

7.1.7) เล็กตินจากเห็ดในเขตร้อน

7.1.8) ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

7.1.9) β-Carotene production by microorganisms

7.1.10) Detection of Bacteria Causing Mastitis in Dairy Cows by Polymerase Chain Reaction

7.1.11) Development of Potential Microorganisms for L-Lactic Acid Production

7.2) งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (นำเสนอบางส่วน): ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์

สุรีลักษณ์ รอดทอง หนึ่งเตียอำรุง และ พินิจ ชูคล้าย. 2541. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 58 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เธียรหิรัญ หนึ่งเตียอำรุง และ พินิจ ชูคล้าย. 2542. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 157 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เธียรหิรัญ และ หนึ่งเตียอำรุง. 2543. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา และ หนึ่ง เตียอำรุง. 2545. *ความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตแบซิลลัสในหญ้าหมักของไทย*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 68 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2545. *การอยู่รอดของแลคโตแบซิลไลจากหญ้าหมักในทางเดินอาหารของโค*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 63 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง หนึ่ง เตียอำรุง และ นันทกร บุญเกิด. 2545. *การเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 85 หน้า.

จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล สุรีลักษณ์ รอดทอง และ ปิยะวรรณ กาสลัก. 2546. *ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 98 หน้า.

Rodtong, S. and Tannock, G.W. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10): 3480-3484.

Rodtong, S., Dobbinson, S., Thode-Andersen, S., McConnell, M.A., and Tannock, G.W. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11): 3871-3877.

Rodtong, S., Teaumroong, N., and Chooklay, P. 1998. A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-rawieng Plant Genetics Forest. *Proceedings of the Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998, Hua Hin, Thailand*: 281-284.

Rodtong, S. 2001. Bacterial strains for the direct production of L-lactic acid from cassava and sago starch. *Proceedings of the International Symposium on "Diversity and Optimum Utilization of Biological Resources in the Torrid and Subtropical Zones", 2 June 2001, Kyushu, Japan*: 4-8.

Rodtong, S. and Ishizaki, A. 2003. Potential microorganism for the direct production of L-lactic acid from cassava starch without carbon dioxide production. *MACRO REVIEW*. 16(1): 332-336.

Rodtong, S. and Ratanachai, K. 2005. Basidiospore ornamentation study of the red russula mushrooms. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 209-210.

Rodtong, S. and Anunputtikul, W. 2005. Conversion of raw cassava roots to biogas. *Proceedings of the 5th Asia-Pacific Conference on Sustainable Energy and Environmental Technologies (APCSEET 5), 8-11 May 2005, Wellington, New Zealand*: 86-91.

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

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. 2001. Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. *Thai Journal of Biotechnology*. 3(1): 17-25.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S.,and Reynolds, C.D. 2005. Lectin crystals from split-gill fungus, *Schizophyllum commune*. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 205-206.

Edwards, R.L., Jonglaekha, N., Kshirsagar, A., Maitland, D.J., Mekkanol, S., Nugent, L.K., Phosri, C., Rodtong, S., Ruchikachorn, N., Sangvichien, E., Sharples, G.P., Sihanonth, P., Suwannasai, N., Thienhirun, S., Whalley, A.J.S., and Whalley, M.A. 2003. The Xylariaceae as phytopathogens. *Recent Research Developments in Plant Sciences*. 1: 1-19.

Green, D. H., Lewis, G.D., Rodtong, S., and Loutit, M.W. 1991. Detection of faecal pollution in water by an *Escherichia coli uid*A gene probe. *Journal of Microbiological Methods*. 13: 207-214.

Suwannasai, N., Rodtong, S., Thienhirun, S., and Whalley, A.J.S. 2005. Perispore ornamentations for the indication of *Hypoxylon* species. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 207-208.

Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Ng, J., Munro, K., and Alatossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4264-4267.

Towprayoon, S., Rodtong, S., Feungchan, S., Chindaprasert, S., Yimsawat, T., and Kitpowsong, P. 1996. *Rhizobium* studies on tamarind root. *Thai Journal of Agricultural Science*. Special issue 1: 57-67.

Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., and Munro, K. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(1): 297-303.

7.3) งานวิจัยที่กำลังทำ :

7.3.1) ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย: หัวหน้าโครงการวิจัย

7.3.2) การเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาโดยใช้กล้าเชื้อและโปรติเนส: ผู้ร่วมวิจัย

7.3.3) ปลาส้มสำเร็จรูปพร้อมรับประทาน: ผู้ร่วมวิจัย

7.3.4) การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในปลากะตักและผลิตภัณฑ์ปลาหมักดอง: ผู้ร่วมวิจัย

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี