รายงานการวิจัย

Halotolerant histamine-forming แบคทีเรียและปริมาณไบโอเจนีกเอมีนในอาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ประเทศไทย

Halotolerant histamine-forming bacteria and biogenic amine contents of fermented seafood products in Nakhon si thammarat province, Thailand

ลัญจกร จันทร์อุดม

มณฑกานต์ ทองสม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

ชื่อเรื่อง Halotolerant histamine-forming แบคทีเรียและปริมาณไบโอเจนีกเอมีนในอาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ประเทศไทย

ผู้วิจัย ลัญจกร จันทร์อุดม และมณฑกานต์ ทองสม

ปีงบประมาณ 2557

.....

บทคัดย่อ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ระหว่างช่วงเดือน เมษายน – มิถุนายน 2557 อำเภอละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง พบว่าค่า pH ของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 4-7 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.67±0.63 ในขณะที่ปริมาณเกลือของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 5-30% โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 19.56±5.62 % ปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 200-1,300 mgN/100g ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 697.53±26.05 mgN/100g ตัวอย่าง และปริมาณ TMA ในตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 14-150 mgN/100g ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 64.02±5.72 mgN/100g ตัวอย่าง ทั้งนี้ในตัวอย่างรหัส B1 และ E3 มีปริมาณฮีสตามีนสูงสุดอยู่ในช่วง 75 – 100 ppm โดยรหัสตัวอย่าง B3 เป็นผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม และตัวอย่างรหัส E3 เป็นผลิตภัณฑ์ไตปลา โดยในตัวอย่าง B3 (ผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม) มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงที่สุดอยู่ที่ 8.8 x 10^6 CFU/g และพบเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์รหัส A2 A4 B3 และ F5 สามารถคัดแยกเชื้อ histamine forming bacteria ได้ทั้งหมด 27 isolates โดย isolates A18 A412 และ A51 สามารถสร้างฮีสตามีนในสูงสุด อยู่ที่ระดับ 41.26±0.02 – 41.29±0.02 ppm ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อทั้ง 3 isolates มาทำการศึกษาผลของปริมาณ NaCl ต่อการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ พบว่าทุก isolates สามารถ

เจริญได้ในทุกระดับความเข้มข้นของ NaCl ทั้งนี้ปริมาณ NaCl ตั้งแต่ 5 – 20% ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างฮีสตามีน โดย isolate A18 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุดเท่ากับ 411.27±0 09 ppm

Research Tittle Halotolerant histamine-forming bacteria and biogenic amine contents of fermented seafood products in Nakhon si thammarat province, Thailand

Author Lanchakon Chanudom and Montakarn Thongsom

Fiscal year 2014

Abstract

30 samples of fermented seafood products were collected at Nakhon si thammarat province area during April – June 2014, 5 samples per each city. The pH of samples are between 4-7, mean at 5.67±0.63. Total salt content of samples are between 5-30%, mean at 19.56±5.62%. TVB-N in 30 samples are between 200-1,000 mgN/100g sample and mean at 697.53±26.05 mgN/100g sample while TMA are between 14-150 mgN/100g sample and mean at 64.02±5.72 mgN/100g sample. Moreover the highest histamine was found in sample code B1 and E3 when B1 is salted dry fish and E3 is fermented fish product. Total microorganism was found in sample code B3 (salted dry fish) at $8.8X10^{6}$ CFU/g and the contamination of *E. coli* was found in sample code A2 A4 B3 and F5. The isolation of histamine forming bacteria was done and 27 isolates were isolated. Isolates A18 A412 and A51 were produced highest histamine contents in media between 41.26±0.002 – 41.29±0.02 ppm, respectively. The 3 isolates were continued investigate on the effect of NaCl on histamine production and were resulted that NaCl is

not effected to their growth and NaCl at 5-20% were not inhibited the histamine production of all isolates. The highest histamine producing was found on isolate A18.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ประจำปีงบประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ในการเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ในการวิเคราะห์อุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ทำให้งานวิจัยสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ และสำเร็จลุล่วงลงได้เป็นอย่างดี

สุดท้ายผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับนักวิจัยหรือผู้ที่สนใจในการค้นคว้าต่อไปในอนาคต

ลัญจกร จันทร์อุดม

มณฑกานต์ ทองสม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
Abstract	(ค)
กิตติกรรมประกาศ	(จ)
สารบัญ	(ฉ)
สารบัญตาราง	(ฌ)
สารบัญรูป	(ญ)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	4
2.1 ไบโอเจนิกเอมีน	4
2.2 ฮีสตามีน	4
2.3 การเกิดฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์	6
2.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดไบโอเจนิกเอมีน	8

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 ความเป็นพิษของฮีสตามีนต่อมนุษย์	9
2.6 การลดปริมาณฮีสตามีนโดยจุลินทรีย์	12
2.7 สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ decarboxylase	17
2.8 การหมักดอง	19
2.9 ข้อดีของการหมัก	22
2.10 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	25
สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	25
วิธีการวิจัย	27
3.1 การวิเคราะห์ pH ปริมาณเกลือ total volatile basic nitrogen (TVB-N) ปริมาณ Trimethylamine (TMA) และปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก	27
3.2 การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์และการคัดแยก histamine-forming แบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารทะเลหมัก	30
3.3 การศึกษาผลของ NaCl ต่อการสร้าง Histamine ของเชื้อที่คัดแยกได้	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการดำเนินการวิจัย	34
4.1 การเก็บตัวอย่าง	34
4.2 ผลการวิเคราะห์ pH ปริมาณเกลือ total volatile basic nitrogen (TVB-N) ปริมาณ Trimethylamine (TMA) และปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก	36
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก	43
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด total coliform และ *E. coli* ในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก	44
4.5 ผลการคัดแยก Histamine forming bacteria และผลการวิเคราะห์การสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่คัดแยกได้	47
4.6 ผลของปริมาณ NaCl ต่อการสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่คัดแยกได้	56
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	60
บรรณานุกรม	63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณฮีสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก	43
4.2	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก	45
4.3	ปริมาณ total coliform ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก	46
4.4	รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยกได้ 27 isolates	48

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน	5
2.2	การเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีน	6
4.1	พื้นที่เก็บตัวอย่าง 6 อำเภอ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช	34
4.2	ตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่ใช้ในการศึกษา	35
4.3	เปอร์เซ็นการจำแนกประเภทของตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่ใช้ในค่า	36
4.4	pH ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง	37
4.5	ค่า pH ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักแยกตามประเภทของผลิตภัณฑ์	38
4.6	ปริมาณเกลือในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง	40
4.7	ปริมาณเกลือในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักแยกตามประเภทของผลิตภัณฑ์	40
4.8	ปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง	41
4.9	ปริมาณ TMA ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง	42
4.10	ลักษณะเชื้อ histamine-forming bacteria (โคโลนีสีน้ำเงินอมม่วงหรือสีชมพู) ที่ทำการคัดแยกจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก	47
4.11	ปริมาณฮีสตามีนที่สร้างขึ้นในอาหาร TSBH ของเชื้อที่คัดแยกได้ ทั้ง 27 isolates	55

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.12	การเจริญของเชื้อทั้ง 3 isolates ในอาหาร TSBH ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 72 ชั่วโมง	57
4.13	การสร้างฮีสตามีนของเชื้อทั้ง 3 isolates ในอาหาร TSBH ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 72 ชั่วโมง	58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จังหวัดนครศรีธรรมราช มีพื้นที่บางส่วนติดกับทะเลอ่าวไทย ทำให้ประชาชนทั่วไปเข้ามาท่องเที่ยวเป็นจำนวนมาก โดยมุ่งเน้นการมารับประทานอาหารทะเล และชมทัศนียภาพบริเวณชายฝั่ง ส่งผลให้การแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราชเพื่อเพิ่มรายได้มีความหลากหลาย ผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราชมีทั้งในรูปของปลาตากแห้ง กะปิ น้ำปลา และอาหารทะเลหมักหลายประเภท แต่อย่างไรก็ตามมาตรฐานการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในปัจจุบันยังคงอาศัยกรรมวิธีการผลิตอย่างง่าย เป็นธุรกิจขนาดเล็กในครัวเรือน และวางขายในชุมชน ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในพื้นที่ยังคงไม่ได้มาตรฐาน และอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้

ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยา amino acid decarboxylation โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Tsai *et al.*, 2005; Tsai *et al.*,2006) พบได้ในอาหารหลายๆ ชนิด โดยเฉพาะอาหารหมัก เช่น ชีส กิมจิ ไวน์ มิโซ เนื้อหมัก และอาหารทะเลหมัก ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเมื่อบริโภคอาหารที่มีระดับของฮีสตามีน (Histamine) สูง จะมีผลทำให้เกิดอาการแพ้ ที่เรียกว่า สคอมโบรทอกซิโคซิส (Scombrotoxicosis) โดยฮีสตามีนจะไปเพิ่มไบโอเจนิกเอมีนตัวอื่นๆ ได้แก่ คาดาเวอรีน (Cadaverine) และพิวเตรสซีน (Putrescine) ซึ่งสารทั้งสองนี้จะส่งเสริมความเป็นพิษของฮีสตามีน โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยฮีสตามีน เช่น diamine oxidase และ histamine methyl transferase ทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อยฮีสตามีนได้จึงส่งผลให้ระดับของฮีสตามีนในร่างกายสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปในแต่ละคน เช่น คลื่นไส้ หายใจขัด ปวดหัว มีผื่นแดง และความดันเลือดต่ำ เป็นต้น การสร้างสารพิษฮีสตามีนเกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ decarboxylase ย่อยสลายกรดอะมิโนฮีสติดีน โดยการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุล

ของฮีสติดีน (วงศ์ทิพา โรจนประภพ, 2551) แบคทีเรียเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา อาหารทะเล และอาหารหมัก ในอาหารหมักหลายชนิดสามารถพบแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตฮีสตามีนได้ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ส่วนจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถผลิตฮีสตามีนได้ในอาหารหมัก ได้แก่ *Staphylococcus* spp., *Enterobacter cloacae* และ *Candida* spp. ดังนั้นการรับประทานปลา อาหารทะเล และอาหารทะเลหมัก อาจได้รับสารฮีสตามีนปนเปื้อนมากับอาหารได้ ปริมาณฮีสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพอาหารเหล่านั้นได้ เนื่องจากปริมาณที่พบจะสัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase enzyme) ในผลิตภัณฑ์

ในปี พ.ศ. 2550 พบปัญหาสุขภาพที่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลหมักในประเทศไทย ที่จังหวัดสมุทรปราการ โดยมีผู้ป่วย 28 คน เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน และชาปลายมือปลายเท้า หลังจากการรับประทานปลาทูน่าส้มทอดที่มีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่า 400 ppm เข้าไป ซึ่งถือเป็นผลเสียที่เกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก นอกจากนี้ในปัจจุบันหลายประเทศได้หันมาให้ความสำคัญกับปริมาณฮีสตามีนในอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์ทางทะเลกันมากขึ้น เช่น ในผลิตภัณฑ์น้ำปลา ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 500 ppm ยกเว้นประแทศแคนนาดา ที่กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm หรือในผลิตภัณฑ์ปลาทูเค็ม ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm เป็นต้น ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคการศึกษาหาชนิดของ halotolerant histamine-forming แบคทีเรียและศึกษาหาปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราชจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อก่อให้เกิดการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช เพื่อการส่งออกต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในรูปของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช

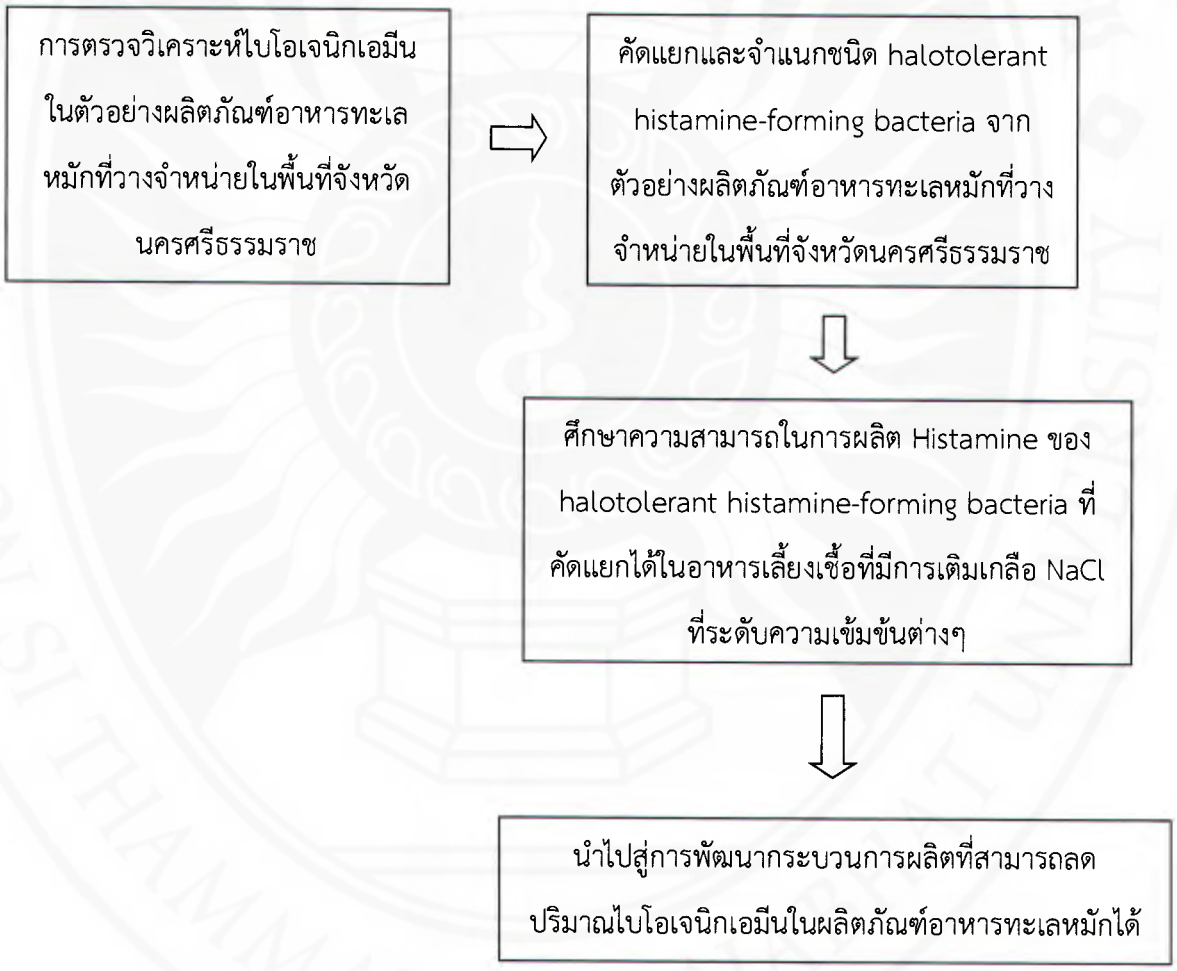
1.2.2 เพื่อคัดแยก halotolerent histamine-forming bacteria จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช

1.2.3 เพื่อศึกษาความสามารถในการลดการผลิต Histamine ของ halotolerant histamine-forming bacteria ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

หาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลหมัก และคัดแยก halotolerent histamine-forming bacteria เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง halotolerent histamine-forming bacteria ที่พบและการเกิดสารไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ และหาแนวทางในการลดปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักที่วางจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช

1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine)

ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ฟังก์ชัน มีคุณสมบัติเป็นเบส น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนความร้อน สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี คือ

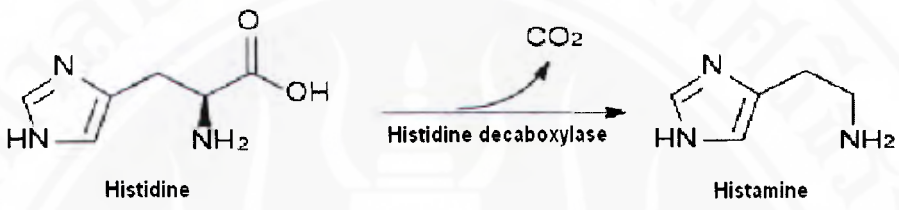
1. Aliphatic amine ได้แก่ putrescine, cadaverine, spermidine และ spermine
2. Aromatic amine ได้แก่ tyramine และ phenylethylamine
3. Heterocyclic amine ได้แก่ histamine และ tryptamine

2.2 ฮีสตามีน (Histamine)

ฮีสตามีน เป็นสารเอมีนที่สำคัญในร่างกายอีกชนิดหนึ่ง ชื่อของฮีสตามีนมากจาก hist + amine ซึ่ง hist หมายถึง กรดอะมิโนฮีสติดีน ส่วนคำว่า amine หมายถึง สาร vasoactive amine ฮีสตามีนถูกยึดไว้ด้วยพันธะไอออนิกให้อยู่ในแกรนูลภายในเซลล์ด้วยสารมาโครเฮปาริน ฮีสตามีนเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้กระเพาะอาหารหลั่งกรด การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั่วร่างกาย กระตุ้นการทำงานของหัวใจและออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด รวมทั้งเปลี่ยนแปลงสภาพของผนังหลอดเลือดอีกด้วย (วรวุฒิ เจริญศิริ, 2552)

การสร้างฮีสตามีนในร่างกาย (เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 2552) เกิดได้จากหลายกระบวนการ ได้แก่

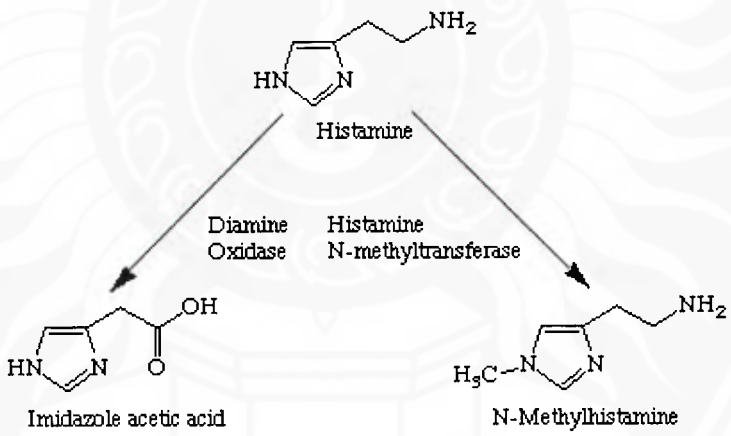
1. ฮีสตามีนที่สร้างมาจากขบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่นของกรดอะมิโนชนิดฮีสติดีน โดยอาศัยเอ็นไซม์ 1-histidine decarboxylase



รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนกรดอะมิโนฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน

ที่มา: University of Bristol, 2008

2. ฮิสตามีนถูกเปลี่ยนเป็นเมธิลฮิสตามีน (N-methylhistamine) หรืออิมิดาโซลอะซิติกแอซิด (Imidazole acetic acid)



รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีน

ที่มา: วรวุฒิ เจริญศิริ, 2009

3. สารฮีสตามีนจะถูกสร้างและเก็บอยู่ในเซลล์มาสต์ (Mast cell) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นจากสารก่อภูมิแพ้หรือกลไกอื่นๆ เซลล์มาสต์และเบโซฟิลจะหลั่งสารฮีสตา

มีนออกมาและกระจายไปตามเนื้อเยื่อและกระแสโลหิตภายในเวลา 2-3 นาที โดยมีระดับสูงสุดที่ 5 นาที และจะกลับสู่สภาวะปกติภายในเวลา 30 นาที

ส่วนการสร้างสารพิษฮีสตามีนในอาหารที่มีแหล่งโปรตีน เกิดจากแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารมีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) ย่อยสลายกรดอะมิโนฮีสติดีน (histidine) โดยการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลของฮีสติดีน ได้เป็นฮีสตามีนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (วงศ์ทิพา โรจนประภพ, 2551) ส่วนใหญ่ฮีสตามีนจะอยู่ในอาหารทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาทะเลในตระกูลสคอมบรอยด์ เช่น ปลาทู ปลาลัง ปลาโอและปลาอีนทรีย์ เป็นต้น ทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า สคอมโบรทอกซิโคซิส (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.3 การเกิดฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์

ปลาสดเมื่อจับมาใหม่ๆ ก่อนจะนำไปแปรรูปจะมีระดับของฮีสตามีนต่ำกว่า 0.1 mg/100 ml เมื่อเก็บปลาสดไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0 $^{\circ}$C จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาจะยังไม่ผลิตฮีสตามีน แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูงขึ้น จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจะเพิ่มจำนวนและผลิตฮีสตามีนในปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ยากที่จะควบคุมปริมาณฮีสตามีนไม่ให้เพิ่มขึ้นใน ระหว่างการขนส่ง (Rossano et al., 2006)

ไบโอเจนิกเอมีนที่พบในอาหารแต่ละชนิดมีปริมาณและชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโปรตีนหรือกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร กระบวนการผลิต รวมทั้งจุลินทรีย์ที่พบในอาหาร โดยสามารถแบ่งอาหารที่มีการพบไบโอเจนิกเอมีนได้เป็น 2 กลุ่ม คือ อาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (non fermented food) ได้แก่ ปลาและผลิตภัณฑ์ประมง เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ผักและผลไม้ และนม กลุ่มที่ 2 คือ อาหารหมัก (fermented food) ในระหว่างกระบวนการหมักหรือกระบวนการผลิตอาหารหมักมักพบจุลินทรีย์หลายชนิดโดยจุลินทรีย์ที่พบส่วนมากมีความสัมพันธ์กับการเกิดไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์

ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์ผักหมัก เนื้อสัตว์หมัก เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก มักพบไบโอเจนิกเอมีนในกลุ่ม putrescine, ornithine, tyramine, tryptamine, spermidine และ histamine (อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์, 2557)

จุลินทรีย์จะผลิตฮีสตามีนเมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 21.1 °C และจะผลิตได้เร็วมากในช่วงอุณหภูมิใกล้ 32.2 °C ฮีสตามีนที่ตรวจพบได้ในปลาเกิดจากจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ histidine decarboxylase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนฮีสติดีน ที่มีอยู่อิสระในกล้ามเนื้อของปลาให้กลายเป็นสารฮีสตามีน (Food and Drug Administration, 2011) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตฮีสตามีนมีหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ มีงานวิจัยหลายฉบับได้ทำการศึกษา และรายงาน ถึงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฮีสตามีนได้ เช่นแบคทีเรียใน ตระกูล Enterobacteriaceae และ Pseudomonaceae แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus, Enterococcus, Staphylococcus* รวม ทั้ง *Morganella morganii, Morganella psychrotolerans, Photobacterium damselae, Photobacterium phosphoreum, Raoultella planticola* และ *Hafnia alvei* (European Food Safety Authority, 2011) และ รายงานของ Chena และคณะ (2008) ได้ตรวจพบ *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans, Klebsiella variicola* แล ะ *Serratia marcescens* ที่สามารถผลิตฮีสตามีนได้ 8.1-19.7 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ เติม L-histidine เข้มข้นร้อยละ 1.0 สามารถตรวจพบแบคทีเรียที่ผลิตฮีสตามีนได้ที่เหงือก ผิวหนัง หรือทางเดินอาหารของปลา โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะเคลื่อนที่เข้าไปในเนื้อปลาซึ่งมีกรดอะมิโนอิสระ และผลิตฮีสตามีนขึ้น แบคทีเรียสามารถเคลื่อนผ่านทางเดินอาหารในระหว่างการชำแหละและการแล่เนื้อปลา ปริมาณของฮีสตามีนที่ผลิตขึ้นอยู่กับระดับของกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของปลา และกิจกรรมของเอนไซม์ ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส และยังพบว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผล ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตฮีสตามีน มีการศึกษาพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลัก โดยที่ปริมาณฮีสตามีนจะขึ้นอยู่กับทั้งอุณหภูมิ

และเวลา กล่าวคือถ้าจุลินทรีย์อยู่ในที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้เก็บปลาเป็นเวลานาน จะส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้มากและผลิตฮีสตามีนมากตามไปด้วย ส่วนปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ค่าความเป็นกรด- ด่าง ความเข้มข้นและชนิดของเกลือ ภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน และความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียอื่นๆ (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2012)

2.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดไบโอเจนิกเอมีน

สภาวะที่ส่งผลต่อปริมาณสารไบโอเจนิกเอมีนในอาหาร สามารถสรุปได้ ดังนี้ (วีรชัย สิงห์ทอง, 2556)

1. ชนิดของอาหารที่มีปริมาณกรดอะมิโน และสารอาหารชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ วิตามิน เป็นต้น
2. สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์
3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส
4. ระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหาร
5. อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร
6. ความเป็นกรด-ด่าง
7. ปริมาณเกลือ
8. ปริมาณออกซิเจน
9. ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (water activity, Aw)

2.5 ความเป็นพิษของฮีสตามีนต่อมนุษย์

โรคอาหารเป็นพิษจากสาร Scombrotoxin (หรืออีกชื่อคือ Scombroid) เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารฮิสตามีนปริมาณมาก สารพิษดังกล่าวเป็นสาเหตุอันดับสองของอาหารทะเลเป็นพิษที่เกิดขึ้นได้ทั่วไป และพบมากในบริเวณอากาศร้อนชื้น รายงานการระบาดของอาหารเป็นพิษจากสาร Scombroid ครั้งล่าสุดเกิดขึ้นแถบเอเชียตะวันออกประเทศไต้หวันปี พ.ศ 2540 มีนักเรียนอนุบาลติดเชื้อจานวน 94 ราย จากรายงานที่ตีพิมพ์ใน MMWR ของศูนย์ควบคุมป้องกันโรคแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (US CDC) อธิบายการระบาดของสารพิษ Scombroid ในอเมริกาเหนือโดยปลาที่นำเข้าจากประเทศเวียดนามและประเทศอินโดนีเซีย โรคอาหารเป็นพิษจากสาร Scombroid จะมีอาการป่วยเหมือนกับการได้รับสารฮีสตามีน ซึ่งก่อให้เกิดอาการแพ้ในลักษณะต่างๆ ผู้ป่วยที่รับสารพิษ Scombroid จะมีอาการผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย หรือ อาการอื่นๆ ปกติแล้วอาการป่วยจะมีตั้งแต่ไม่รุนแรงและสามารถหายได้เอง ส่วนในกรณีที่อาการรุนแรง ผู้ป่วยอาจมีอาการความดันเลือดต่า เห็นภาพซ้อน แสบร้อนบริเวณลิ้น มีเอกสารกล่าวถึงเกี่ยวกับผู้ป่วยได้รับพิษ Scombroid แต่ไม่มีเอกสารใดกล่าวถึงการได้รับพิษดังกล่าวจนถึงขั้นเสียชีวิต

โรคอาหารเป็นพิษจากสาร Scombrotoxin ปกติเกิดหลังจากรับประทานปลาที่ไม่ได้แช่เย็นโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาประเภท ปลาทูน่า และปลาแมคคอเรล ปลาในตระกูล *Scombridae* และ *Scomberosocidae* เนื้อปลาในกลุ่มนี้มีปริมาณฮิสติดีนสูง ซึ่งเมื่อไม่ได้เก็บในตู้เย็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ histidine decarboxylase จะทำหน้าที่เปลี่ยนฮีสติดีนในเนื้อปลาให้กลายเป็นฮีสตามีน แม้ว่าแบคทีเรียทั่วไปจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อนจากการประกอบอาหาร แต่ฮีสตามีนสามารถทนความร้อนได้ แต่ในเนื้อปลาและอาหารอื่นๆที่มีสารฮีสตามีนในปริมาณสูงโดยทั่วไปจะไม่มีกลิ่นหรือรสที่ผิดแปลกไปจากปกติ ปริมาณความเข้มข้นของการเกิดสารฮีสตามีนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ decarboxylase และอุณหภูมิหรือสภาพการเก็บรักษาเนื้อปลา การรับประทานเนื้อปลาที่

มีปริมาณฮีสตามีนในระดับที่สูงกว่า 200 ppm (20 mg/100g) อาจมีผลให้เกิดอาการป่วยได้ ประเทศในเครือสหภาพยุโรปมีมาตรฐานซึ่งกำหนดระดับของสารฮีสตามีนในปลาทะเลแช่แข็งได้ไม่เกิน 100 ppm (10 mg/100g)

ความเป็นพิษของไบโอจินิกเอมีนสัมพันธ์กับการได้รับประทานปลาในตระกูลสคอมบรอยด์ (Family Scombroid) เช่น ปลาทูน่า ปลาโบนิโต และปลาโอ เป็นต้น ปลาเหล่านี้เป็นอาหารทะเลที่ทำให้ผู้บริโภคส่วนใหญ่ ได้รับสารฮีสตามีน ความเป็นพิษพบทั้งในผู้ป่วยที่บริโภคปลาสดและปลาที่ประกอบอาหารแล้ว การรับประทานสารประกอบไบโอจินิกเอมีนที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร จะเป็นผลให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีน และไทรามีน โรคอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีนหรือจากสารพิษสคอมบรอยด์ (Scombroid poisoning) จึงได้มีความสำคัญต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษทั่วโลกในทุกวันนี้ โดยทั่วไปจะไม่สามารถสังเกตเห็นได้ว่าในเนื้อปลามีปริมาณฮีสตามีนมากเท่าใด ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิตั้งแต่ขั้นตอนการจับปลาจนถึงการประกอบอาหารในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเป็นการป้องกันการเพิ่มปริมาณฮีสตามีนได้ดีที่สุด ผู้ที่รับประทานฮีสตามีนในปริมาณมาก เกินไปจะก่อให้เกิดอาการแพ้ มีผื่นคัน หน้าแดง แสบร้อน บริเวณปาก ปวดศรีษะ บางรายอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย อาการเหล่านี้จะหายได้เอง แต่ผู้ป่วยบางคนอาจมีอาการระบบไหลเวียนล้มเหลว ช็อก และน้ำท่วมปอดฉับพลัน (วงศ์ทิพา โรจนประภพ, 2551) มีรายงานพบว่าการมีพิวตริซีน และคาดาเวอรีนอยู่ในอาหาร จะทำให้เพิ่มความเป็นพิษของฮีสตามีน (Taylor และ Speckhard, 1983) และพบอีกว่าเอมีนเป็นสารที่เมื่อทำปฏิกิริยากับ สารประกอบไนไตรต จะได้สารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Shalaby, 1996) แต่อย่างไรก็ตามคนที่มีสุขภาพดีจะสามารถย่อยสลายฮีสตามีนได้ แต่หากสะสมฮีสตามีนในปริมาณที่มากกว่าที่ร่างกายย่อยสลายได้ก็จะส่งผลให้เกิดอาการโรคอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีนขึ้นได้

ระบบการทำลายพิษของฮีสตามีนในร่างกายมนษุย์ประกอบไปด้วยการทำงานของเอนไซม์ diamine oxidase (DAO) และ histamine N-methyl transferase โดยที่ DAO จะแสดงบทบาทหลัก

ในการย่อยสลายฮีสตามีนภายในเซลล์ ขณะที่ histamine N-methyl transferase สามารถย่อยสลายฮีสตามีนได้ภายนอกเซลล์ การรักษาโรคอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีนทำได้โดยการใช้แอนติฮีสตามีน (antihistamines)

ปัจจุบันหลายประเทศให้ความสำคัญกับปริมาณฮีสตามีนโดยใช้เป็นข้อกำหนดตัวบ่งชี้ชนิดหนึ่งที่บ่งบอกถึงคุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา การกำหนดปริมาณการยอมรับสารฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของปลา รวมถึงในแต่ละประเทศมีการกำหนดให้มีปริมาณฮีสตามีนได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่มีได้ไม่เกิน 500 ppm ข้อกำหนดบ่งชี้คุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาแต่ละชนิด มีดังนี้ (วงศ์ทิพา โรจนประภพ, 2551)

1. ปลาทูน่า (tuna) สคอมบริดี (scombridae) ปลาทูปลาหลังเขียว และปลาซาบะ (saba) ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ และอิสราเอล กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm ประเทศแคนาดา ประเทศในเครือสหภาพยุโรป หรือ EU และประเทศอื่นๆ กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 ppm ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 50 ppm

2. ปลาทูน่า ปลาแซลมอน (salmon) ปลาทู และ ปลาเฮอริง (herring) ประเทศญี่ปุ่นกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 ppm

3. ปลากะตักตากแห้ง (dried anchovy) และปลาทูน่าตากแห้ง (dried tuna, Katsuobushi) ทุก ประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm

4. น้ำปลาทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบ ได้ไม่เกิน 500 ppm ยกเว้นประเทศแคนาดา ที่กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm ปลาทูเค็ม (salted mackerel) ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm

5. ปลานึ่ง (steamed scombridae) ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 ppm

2.6 การลดปริมาณฮีสตามีนโดยจุลินทรีย์

ฮีสตามีนมีความทนทานต่อความร้อน และไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัส ฮีสตามีนถูกทำลายได้ยากด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งการแช่แข็ง การให้ความร้อน หรือการรมควัน (Etkind et al., 1987) การควบคุมปริมาณฮีสตามีนจะเน้นในด้านการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดฮีสตามีน เช่น การเติมสารกันเสียบางชนิด เช่น โซเดียมซอร์เบท โซเดียมเฮกซะเมทาฟอสเฟต กรดซิตริก กรดซัคซินิค กรดมาลิก และซอร์บิทอล เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่มีรายงานว่าจะสามารถทำลายฮีสตามีนได้ ได้แก่ การฉายรังสี และการใช้จุลินทรีย์มาย่อยสลายฮีสตามีน โดยจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการ ลดปริมาณฮีสตามีน ได้แก่ รา *Pencillium citrinum*, *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Ulocladium chartarum* และ *Epicoccum nigrum* และแบคทีเรีย *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *Staphylococcu sxylosus*, *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007, *Virgibacillus* sp. SK33, *Natrinema gari*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Staphylococcus carnosus* เป็นต้น ราที่มีความสามารถในการลดปริมาณฮีสตามีน ได้แก่ *Pencillium citrinum*, *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Ulocladium chartarum* และ *Epicoccum nigrum* มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนได้สูงสุด และยังพบอีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pencillium citrinum* ที่แยกเอาเซลล์ออกไปแล้ว สามารถย่อยสลายฮีสตามีน ไทรามีน และพิวตริซีนได้ (Cueva et al., 2012) *Lactobacillus* spp. ถูกนำมาใช้ในการลดปริมาณสารประกอบไบโอจินิกเอมีน จากรายงานของ Dapkevicius และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไบโอจินิกเอมีน ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาแมคคาเรลหมัก (mackerel fish paste) พบว่า

สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus sakei* 15.05, *L. sakei* 15.18, *L. sakei* 15.36, *L. sakei* 15.39 และ *L. curvatus* 15.35 ซึ่งสามารถย่อยสลายฮีสตามีนได้ ร้อยละ 20-54 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ deMan Rogosa and Sharpe (MRS) broth ที่ประกอบไปด้วยฮีสตามีน 50 ppm และพบว่า *L. sakei* 15.18 และ *L. sakei* 15.36 ย่อยสลายฮีสตามีนได้ร้อยละ 50-54 ใน fish slurry ที่มีฮีสตามีน 10 ppm สำหรับ *L. sakei* 15.18 และ *L. sakei* 15.36 เป็นจุลินทรีย์ซึ่งเป็นกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักปลา และมีผลทำให้เกิดการย่อยสลายฮีสตามีน เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ DAO ที่สามารถย่อยสลายฮีสตามีนได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของ DAO เท่ากับ 37 $^{\circ}$C นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในการควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของไดเอมีนออกซิเดส จะมีส่วนช่วยในการย่อยสลายสารประกอบฮีสตามีนในอาหารได้ Mah และ Hwang (2009) พบว่า *Staphylococcus xylosus* No.0538 ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลากะตักหมักที่ชื่อว่า Myeolchi-jeot มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้ถึง ร้อยละ 38 และย่อยสลายไทโรซีนได้ร้อยละ 4.4 พบว่า *Staphylococcus xylosus* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมักปลากะตักที่มีการเติมเกลือ และสามารถลดปริมาณสารประกอบไบโอจินิกเอมีนได้ร้อยละ 16 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม และยังพบอีกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตสารที่คล้ายแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการทำลาย *Bacillus licheniformis* ที่เป็นแบคทีเรียที่ผลิตฮีสตามีนได้ฮีสตามีนออกซิเดสที่ทนความร้อน (thermostable histamine oxidase) ซึ่งแยกได้จาก แบคทีเรีย *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007 ที่คัดแยกมาจากดิน มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนได้โดยต้องมีสารประกอบคอปเปอร์เป็นตัวกระตุ้น ให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ histamine oxidase โดยที่เอนไซม์ดังกล่าวทำงานได้โดยทนอุณหภูมิได้สูงถึง 65-70 $^{\circ}$C และค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9 (Sekiguchi, Y. et all., 2004) Yongsawatdigul และคณะ (2007) รายงานว่าได้ทำการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการหมักน้ำปลาจากปลากะตัก พบว่า *Virgibacillus*

sp. SK33 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถลดปริมาณฮีสตามีนได้ถึงร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม และเมื่อหมักน้ำปลาเป็นเวลา 4 เดือน และ 12 เดือน จะตรวจพบชนิดของสารระเหยในน้ำปลาที่มีความคล้ายกัน Tapingkae และคณะ (2010) ได้ศึกษาความสามารถของ extremely halophilic archaea ในการลดปริมาณฮีสตามีน ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง และทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในการทดลองได้คัดแยก extremely halophilic archaea 156 สายพันธุ์ จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก และพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ HDS3-1 ที่คัดแยกได้จากน้ำปลาจากปลากะตักที่ผ่านการหมักมาเป็นเวลา 3 เดือน จะมีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนได้ในปริมาณสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เชื้อ halophilic medium ที่เติมฮีสตามีนความเข้มข้น 5 mM ตามมาด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ HDS1-1 HPC1- 2 และ HIS40-3 ตามลำดับ จุลินทรีย์สายพันธุ์ HDS3-1 ถูกจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อ *Natrinema gari* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงโดยย่อยสลายฮีสตามีนได้ดีสุด เมื่ออยู่ในภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5-8 ในที่มีโซเดียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 3.5-5 M และอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส Zaman และคณะ (2010) ได้คัดแยก จุลินทรีย์จากน้ำปลา 5 ตัวอย่าง พบว่ามี 8 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเอมีนได้ โดยพบ *Bacillus amyloliquefaciens* FS-05 และ *Staphylococcus carnosus* FS-19 สามารถย่อยสลายฮีสตามีนได้ถึงร้อยละ 59.9 และ 29.1 ตามลำดับ โดยเชื้อทั้งสองทนเกลือได้ถึงร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 45 °C Lee และคณะ (2013) ได้ศึกษาการเร่งการหมักน้ำปลาจากปลากะตัก โดยการเติมโคจิเชื้อ *Aspergillus oryzae* และฮีสติดีน จากการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่ได้จากการหมักเป็นเวลา 12 และ 15 เดือน มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ระหว่าง 3.7-3.8 mg/mL พบปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นในเวลา 6 เดือนของการบ่มและหลังจากนั้นจะลดลง โดยที่พบปริมาณฮีสตามีน ที่ 25 °C และสูงกว่า 15 °C เมื่อบ่มเป็น เวลา 6 เดือน และ 12 เดือน พบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 และ 12 เดือน ที่ 15 °C โคจิจะลดปริมาณฮีสตามีนลงได้ แบคทีเรียที่ย่อยสลายฮีสตามีนได้ที่แยกจากจากน้ำปลาจากปลากะตัก คือ *Staphylococcus xylosus*

โดย มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นกลาง แต่จะถูกยับยั้งการเจริญในภาวะที่มีการเพิ่มปริมาณเกลือ โซเดียมคลอไรด์ กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก

Gardini และคณะ (2001) ทำการศึกษาผลของ pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการเจริญ กิจกรรมการสลายโปรตีน และการสร้างไบโอเจนิกเอมีน โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่าที่ pH 5.8 อุณหภูมิ 37°C ความเข้มข้นของ NaCl 3% เชื้อสามารถสร้าง tyramine เท่ากับ 3.92 ppm และที่ pH และอุณหภูมิเดียวกัน แต่ความเข้มข้นของ NaCl 5% พบว่ามีการสร้าง tyramine ลดลงเท่ากับ 1.6 ppm

Kimura และคณะ (2001) ศึกษาการสร้างฮีสตามีนใน *Tetragenococcus muriaticus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ halophilic lactic acid bacteria ที่แยกได้จากน้ำปลา พบว่าเชื้อมีการสร้าง Histamine ที่ pH 5.8 ความเข้มข้นของ NaCl 5-7% ความเข้มข้นของกลูโคส 1% และในสภาวะไม่มีออกซิเจน มีการสร้าง Histamine อยู่ในช่วง 2.4 – 1,153.4 ppm

ศิริรัตน์ ตันไสว (2547) ทำการคัดแยกเชื้อแลกติกแบคทีเรียจำนวน 251 ไอโซเลต จากตัวอย่างอาหารหมักไทย 33 ตัวอย่าง มี 115 ไอโซเลต ที่เจริญที่อุณหภูมิ 45 °C และมีเพียง 16 ไอเซเลต ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปนติเอสไปทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ไบโอเจนิกเอมีน พบว่าแลกติกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus* sp. H2, H5 และ H15 แสดงความสามารถในการสร้าง Histamine และ 4 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus* sp. R1 และ R2 และ *Enterococcus* sp. AC2 และ AC3 แสดงความสามารถในการสร้าง tyramine

Mah และ Hwang (2009) ทำการศึกษาผลของสารปรุงแต่งอาหารต่อการเกิดไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เรียกว่า Myeolchi-jeot พบว่าการนำ glycine มาใช้ในกระบวนการผลิตสามารถลดการเกิดสารไบโอเจนิกเอมีน ได้แก่ putrescine, cadaverine, histamine, tyramine และ spermidine

ลงเหลือเพียง 32.6%, 78.4%, 93.2%, 100% และ 100% ตามลำดับ และเมื่อนำ glycine มาประยุกต์ใช้ในกระบวนหมักผลิตภัณฑ์จริง พบว่าสามารถลดการเกิดไบโอเจนิกเอมีนลงได้ 63% และ 73.4% ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการเติมและเติม Nacl 20% ลงในผลิตภัณฑ์

Lin และคณะ (2012) ทำการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลหมักเกลือจำนวน 57 ตัวอย่าง (ผลิตภัณฑ์ปลา หอย และกุ้งหมัก) จากหมู่บ้านประมงในประเทศไตหวัน พบว่าปริมาณไบโอเจนิกเอมีน 9 ชนิด ได้แก่ agmatine, tryptamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine และ spermine ในตัวอย่างส่วนใหญ่น้อยกว่า 5 mg/100g ตัวอย่าง และพบว่าในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล 6 ชนิด มีปริมาณ histamine สูงกว่า 5 mg/100g ตัวอย่าง ซึ่งสูงกว่าค่าที่ US Food and Drug Administration กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิต histamine ได้ 78.5 ppm ในอาหาร trypticase soy broth (TSB) ที่เติม 1% L-histidine (TSBH) โดยสามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus megaterium* ซึ่งเชื้อ *B. megaterium* เป็นเชื้อที่ทนเค็มได้ดี โดยสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBH ที่มี NaCl 15% และสามารถผลิตฮีสตามีนได้มากกว่า 300 ppm เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBH ที่มี NaCl 10% หลังจาก 72 ชั่วโมง

Zhai และคณะ (2012) ทำการศึกษาปริมาณไบโอเจนิกเอมีน 8 ชนิด (histamine, tryptamine, putrescine, 2-phenylethylamine, cadaverine, tyramine, spermidine และ spermine) ในตัวอย่างปลา 13 ชนิด และในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลา 49 ชนิด ที่นิยมรับประทานทางตอนใต้ของจีน พบว่าปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างปลา อยู่ในช่วง 5.03 – 156.17 mg/kg โดยมีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่า 21.85 mg/kg และพบปริมาณไบโอเจนิกเอมีนสูงในผลิตภัณฑ์ปลาหมักและปลาบรรจุถุง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์ lightly cured horse mackerel พบปริมาณ 2-phenylethylamine เท่ากับ 57.61 mg//kg cadaverine เท่ากับ 244.41 mg/kg และมีปริมาณ tyramine เท่ากับ 62.85 mg/kg

จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนจะอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีหน้าที่หลักในการหมักผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก แบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง และแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีความเข้มข้นของเกลือไม่สูง ส่วนราก็เป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทในการลดปริมาณฮีสตามีน แต่ยังมีรายงานไม่มากเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนได้ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสได้ ดังนั้นหากควบคุมให้ในผลิตภัณฑ์มีปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ก็จะสามารถควบคุมให้ปริมาณฮีสตามีนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

2.7 สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ decarboxylase

1. ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิส่งผลต่อการเกิดสารไบโอเจนิกเอมีนในการแปรรูปปลาและชีส และพบว่าอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเก็บรักษา เนื่องจากอุณหภูมิส่งผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ เช่น การเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ protease และเอนไซม์ decarboxylase การสะสมของสารไบโอเจนิกเอมีนจะเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดสารไบโอเจนิกเอมีนอยู่ระหว่าง 20-37 $^{\circ}$C อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาจจะส่งผลต่อปริมาณไบโอเจนิกเอมีนแต่ไม่สามารถที่จะส่งผลต่อปริมาณสารไทรามีนที่เกิดขึ้น ปริมาณของสารไบโอเจนิกเอมีนจะลดลงเมื่อเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 $^{\circ}$C หรือมากกว่า 40 $^{\circ}$C

สารฮีสตามีนจะเกิดช้ามากเมื่อเก็บรักษาอาหารที่ 10 °C เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ histidine decarboxylase เจริญเติบโตช้าที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่ง *Morganella morganii* มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮีสตามีนในอาหารทะเลแม้ว่าจะเก็บรักษาอาหารทะเลที่อุณหภูมิสูงกว่า 7-10 °C ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาการพิ่มมากขึ้น สำหรับอาหารที่มีการแช่แข็ง เช่น ปลาแช่แข็ง แบคทีเรีย psychrotolerant สามารถทำงานและก่อให้เกิดสารเอมีนสะสมในอัตราสูงระหว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C เมื่อเก็บรักษาอาหารเป็นระยะเวลานาน *Photobacterium phosphoreum* และ *Morganella phychrotolerant* จะทำให้อาหารเกิดสารไบโอเจนิกเอมีนได้ง่าย เช่น ไทรามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ด้วยเหตุนี้ควรเก็บรักษาอาหารภายใต้อุณหภูมิต่ำเพื่อลดการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างเอนไซม์ decarboxylase โดยจุลินทรีย์

2. ผลของ pH

pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ amino decarboxylase โดย pH จะส่งผลต่อการเกิดไบโอเจนิกเอมีนโดยการส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจาก pH ที่เป็นกรดจะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งส่งผลต่อการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณไบโอเจนิกเอมีนที่เพิ่มขึ้นกับค่า pH ที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามสารไบโอเจนิกเอมีนที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ decarboxylase ด้วย

3. ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ amino decarboxylase ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน การยับยั้งเอนไซม์ decarboxylase ที่สร้างขึ้นโดย *Staphylococcus capitis, Enterobacter cloacae* และ *Pantoea agglomerans* ทำได้โดยการเติมเกลือลงไปในอาหาร ในทางกลับกันโซเดียมคลอไรด์จะปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ histidine decarboxylase ที่สร้างจาก

Staphylococcus spp. ดังนั้นสามารถที่จะยืนยันได้ว่าโซเดียมคลอไรด์จะส่งผลได้ทั้งการยับยั้งและการกระตุ้นการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน

4. ปริมาณออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนจะส่งผลต่อการเกิดสารไบโอเจนิกเอมีนโดย *Enterobacter cloacae* สามารถสร้างสารพิวเทรสซีนได้ในปริมาณมากภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจน และ *Klebsiella pneumoniaem* สามารถสังเคราะห์คาร์ดาเวรีนได้ในปริมาณเล็กน้อย แต่สามารถสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนได้มากกว่าภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ histidine decarboxylase จะหยุดทำงานหรือถูกทำลายเมื่อมีออกซิเจนอยู่ ในทางกลับกันออกซิเจนส่งผลเล็กน้อยต่อการสังเคราะห์ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน และพิวเทรสซีน ด้วย *Lactobacillus curvatus*

5. ปัจจัยด้านอื่นๆ

ส่วนปัจจัยอื่นๆ เช่น กรดทาร์ทาร์ริก และปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาล พบว่ากรดทาร์ทาร์ริกมีส่วนทำให้ปริมาณพิวเทรสซีนที่สร้างโดย *Lactobacillus hilgardii* มีปริมาณเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามน้ำตาลจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ histidine decarboxylase

2.8 การหมักดอง (Fermented Products)

Fermentation รากศัพท์มาจากภาษาลาติน Fervere ซึ่งแปลว่า To be boiling การเรียกเช่นนี้เป็นเพราะการหมักส่วนใหญ่ในระยะแรกจะมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น ทำให้เป็นฟองปุดๆ ขึ้นมา ลักษณะคล้ายกับการต้มน้ำให้เดือด

Fermentation หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารอินทรีย์ โดยปฏิกิริยาของ enzyme เพื่อทำให้สารอินทรีย์นั้นเป็นสารที่มีองค์ประกอบง่ายขึ้น ในปัจจุบัน Fermentation

หมายความรวมทั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่มีองค์ประกอบง่ายๆ ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนด้วย

ประเภทของการหมัก

1. Aerobic Fermentation คือกระบวนการหมักที่ต้องการ oxygen เช่น การเติมกรดน้ำส้ม (acetic acid) กรดมะนาว (citric acid)

2. Anaerobic Fermentation คือการบวนการหมักที่ไม่ต้องการ oxygen เช่น การผลิต alcohol

การแบ่งประเภทสัตว์น้ำหมักดอง

1. แบ่งตามแหล่งของ enzyme

1.1 การหมักโดยใช้ enzyme จากเนื้อปลาและอวัยวะภายใน การหมักแบบนี้จะเติมเกลือเพื่อป้องกันการเน่าเสียจากจุลชีพ ตัวอย่างเช่น น้ำปลา กะปิ

1.2 การหมักโดยใช้ enzyme จากจุลชีพร่วมกับ enzyme จากปลา การหมักแบบนี้จะเติมเกลือและ carbohydrate ลงไปด้วย ตัวอย่างเช่น ปลาร้า ปลาเจ่า

1.3 การหมักโดยใช้กรดเป็นตัวช่วยการย่อยสลาย ตัวอย่างเช่น fish silage, fish soluble

2. แบ่งตามลักษณะของผลิตภัณฑ์

2.1 ผลิตภัณฑ์ที่ยังคงลักษณะของวัตถุดิบไว้ หรือยังมีลักษณะเป็นชิ้นอยู่ เช่น ปลาทูเค็ม ปลาร้า ปลาส้ม

2.2 ผลิตภัณฑ์ที่วัตถุดิบเปลี่ยนลักษณะไปเป็นชิ้นละเอียด หรือเป็น paste เช่น กะปิ

2.3 ผลิตภัณฑ์ที่วัตถุดิบถูกย่อยเป็นของเหลว เช่น น้ำปลา น้ำบูดู

การหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารโดยใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ โดยจุลินทรีย์นั้นจะสร้างสารบางอย่างขึ้นมาในอาหารซึ่งสามารถยับยังการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ได้ ดังนั้นผลของการหมักจะทำให้อาหารปลอดภัยจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และยังทำให้เกิดอาหารชนิดใหม่ๆ ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม เป็นการเพิ่มกลิ่น และรสชาติของอาหารให้แปลกออกไป (พรพล รมย์นุกูล, 2545) ถ้านำอาหารประเภทหมักดองมาจัดกลุ่มจะได้ 8 กลุ่ม

1. อาหารประเภทผักผลไม้ดอง จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก และที่รู้จักกันดี คือ *Lactobacillus* ในขั้นตอนการผลิตจะเติมเกลือลงในอาหารเพื่อสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมให้แบคทีเรียชนิดที่ต้องการ

2. อาหารประเภทถั่วเหลืองหมัก จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ เชื้อราพวก *Aspergillus* อาหารที่ได้ คือ ซีอิ๊ว เต้าเจียวแบบชาวจีน ซอสทามาริแบบของญี่ปุ่น และเทมเป้แบบชาวอินโดเนเซีย

3. อาหารประเภทข้าวหมัก จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ เชื้อราพวก *Monascus purpureus* อาหารที่ได้ คือ อังคักหรือข้าวแดง ซึ่ง เป็นผลิตภัณฑ์เก่าแก่ของจีน มีสีแดงใช้เป็นสีผสมอาหาร เช่น เหล้าแดง หมูแดง เต้าหู้ยี้ น้ำปรุงเย็นตาโฟ นอกจากข้าวแดงแล้วยังมีข้าวหมากซึ่งเป็นอาหารของคนไทย

4. อาหารประเภทปลาและกุ้ง จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก คือ เชื้อราและยีสต์ ถ้าเติมข้าวสุกและเกลือลงไปจะได้ปลาร้า ปลา จ่อม และปลาส้ม แต่ถ้านำปลาน้ำจืดหรือน้ำเค็มที่มีขนาดเล็กมาหมักกับเกลือในถังไม้หรือถังคอนกรีต ขนาดใหญ่นาน 12-18 เดือนจะมีแบคทีเรียพวก *Bacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในที่มีความเค็มสูงมาช่วยการย่อยโปรตีนในเนื้อปลาที่มีกลิ่นหอมใช้ในการปรุงรสอาหารได้ดี

5. อาหารประเภทเนื้อหมูหรือเนื้อวัวหมัก จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก คือ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกจะได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีรสเปรี้ยว ได้แก่ แหนมและไส้กรอกเปรี้ยวหรือที่เรียกว่าไส้กรอกอีสาน

6. อาหารประเภทไข่หมักดอง จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ แบคทีเรียพวก Coliform และ *Bacillus* วัสดุที่ใช้มักเป็นไข่เป็ดนำมาดองกับน้ำเกลือ ปล่อยไว้จะได้ไข่เค็ม แต่ถ้านำมาพอกด้วยขี้เถ้าเกลือ และปูนขาวแล้วคลุกด้วยแกลบใส่ในไห ปิดสนิทนาน 1 เดือน จะได้ไข่ที่มีไข่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเรียกว่า ไข่เยี่ยวม้า

7. อาหารประเภทน้ำนม จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลกติกจากการย่อยน้ำตาลในนม ทำให้เกิดรสเปรี้ยว จึงเรียกว่านมเปรี้ยว หรือที่นิยมเรียกว่า ยาคูลท์ มีประโยชน์สำหรับคนที่ดื่มนมสดแล้วท้องเสีย

8. อาหารประเภทเหล้าและไวน์ จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ ยีสต์ หมักกับน้ำผลไม้ ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำผลไม้เป็นแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอลกอฮอล์ที่เกิดนี้คือ เอทิลแอลกอฮอล์ มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และ สามารถรับประทานได้ถ้ารับประทานไม่มากหรือไม่ติดต่อกันเป็นเวลานานจะไม่เกิดอันตรายต่อร่างกาย เป็นแอลกอฮอล์ชนิดที่ปลอดภัยที่สุดในบรรดาแอลกอฮอล์ทั้งหลาย และยังทำให้น้ำผลไม้เปลี่ยนเป็นไวน์ที่สามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสีย (นวลจิตต์ เชาวกีรติพงศ์, 2541)

2.9 ข้อดีของการหมัก

ข้อดีของการหมัก มีดังนี้

1. การหมักทำให้อาหารอยู่ในรูปที่ดูดซึมได้ง่ายขึ้น เพราะการหมักเป็นการย่อยสลายสารอาหารโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง

2. อาหารหมักต้องการความระมัดระวังในด้านการสุขาภิบาลน้อยกว่าการแปรรูปวิธีอื่นๆ เนื่องจากการใช้เกลือปริมาณสูงๆ จะช่วยในการกำจัดชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์

3. อาหารหมักมีการยอมรับสูง สามารถใช้เป็นอาหารเสริม เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการได้

4. อาหารหมักเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้อง ไม่ต้องเก็บที่อุณหภูมิต่ำ

5. กระบวนการผลิตอาหารหมักไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษ ทำให้ค่าใช้จ่ายต่ำ

2.10 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria : LAB) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักมากมายหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์ นมหมัก เนย ผักดอง ไส้กรอก อาหารหมักพื้นเมือง เช่น น้ำปลา บูดู ปลาร้า แหนม เป็นต้น แบคทีเรียที่จัดในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc* และ *Streptococcus* แบคทีเรียแลคติกถูกใช้ในการเตรียมและถนอมอาหารประเภทเนื้อ นมและผัก มาเป็นเวลานาน และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (generally recognized as safe: GPRS) ซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะผลิตสารต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ protease สารให้กลิ่นรส และสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่รู้จักดีก็คือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็น bactericidal protein (Tagg et al.,1976) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Yang et al.,1997 พบว่า *Lactobacillus* 13 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้ง 2-pyrrodone-5-carboxylic acid (PCA) ซึ่ง PCA จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิดเช่น *Enterobactor cloaoae* 1575, *Pseudomonas fluorescens* KJLG และ *P. putida* 1560-2 ผลการยับยั้งของ PCA ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงขึ้น แต่จะถูกทำลายเมื่อเติม ammonium hydroxide และ PCA จะมีผลการยับยั้งน้อยกว่ากรดแลคติกเล็กน้อย

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร และผลิตอาหารที่ดีต่อสุขภาพอนามัย ซึ่งพบได้ทั้งในอาหารหมักดองของพืช เช่น กะหล่ำปลีดอง แตงกว่าดอง และประเภทสัตว์ เช่น ปลา กุ้ง เนื้อ การหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย ในการเตรียมอาหารเหล่านี้เพื่อบริโภคอาจผ่านความร้อนเล็กน้อยหรือไม่ก็ได้ถือเป็นการประหยัดพลังงาน และมีข้อดี สามารถยับยั้งเชื้อที่ทำให้อาหารเน่า

เสีย หรือสร้างสารพิษใด การสร้างกรดยังทำให้อาหารรสชาติที่จำเพาะและเพิ่มคุณค่าทางอาหารอีกด้วย อาหารหมักที่มีแบคทีเรียแลคติกเกี่ยวข้องจึงเป็นอาหารของประชากรโลกที่พบในทุกๆทวีป แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียชนิดที่เติบโตในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารมาก แต่ก็สามารถเติบโตได้ในแหล่งอาหารทั่วๆไป และจะทำให้ PH ของอาหารต่ำลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเติบโตได้ พบว่า *Leuconostoc* และ *Streptococcus* ที่สร้างกรดแลคติกจะทำให้ pH ต่ำสุดที่ 4-4.5 ส่วน *Lactobaacillus* และ *Pediococcus* บางสายพันธุ์ จะทำให้ pH ต่ำประมาณ 3.5 ก่อนจะมีการยับยั้งการเติบโตของตัวเอง (Steinkraus,1992)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- Silver nitrate ($AgNO_3$)
- Potassium chromate (K_2CrO_4)
- Trichloroacetic acid (TCA)
- Boric acid (H_3BO_3)
- Potassium carbonate (K_2CO_3)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Formaldehyde
- Sodium chloride (NaCl)
- L-histidine

ชุดทดสอบ

- HistaStrip™ Test Manual
- Veratox® Elisa

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Plate Count Agar (PCA)
- Trypticase Soy Broth (TSB)
- Trypticase Soy Agar (TSA)
- Lauryl Tryptose Broth (LST)
- Brilliant Green Bile Broth (BGBB)
- EC medium (EC)
- Eosin Methylene Blue Agar (L-EMB)

อุปกรณ์

- pH meter
- Microplate reader
- Incubator
- Hot air oven
- Auto pipette
- Microwell plate
- Autoclave
- Vortex
- Microscope
- Conway's dish

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ pH ปริมาณเกลือ total volatile basic nitrogen (TVB-N) ปริมาณ Trimethylamine (TMA) และปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลหมักในเขตพื้นที่อำเภอ 6 อำเภอที่ติดกับทะเลอ่าวไทยของจังหวัดนครศรีธรรมราช ได้แก่ อำเภอขนอม อำเภอสิชล อำเภอท่าศาลา อำเภอเมือง อำเภอปากพนัง และอำเภอหัวไทร จำนวน 30 ตัวอย่าง ระหว่างช่วงเดือน เมษายน – มิถุนายน 2557

3.1.2 การวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณเกลือ ปริมาณ TVB-N และปริมาณ TMA

3.1.2.1 การวิเคราะห์ค่า pH

นำตัวอย่างมา 10 g เติมน้ำกลั่นลงไป 10 mL ปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 5 นาที วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

วิเคราะห์ปริมาณเกลือในตัวอย่างอาหารทะเลหมักตามวิธี AOAC (1995) โดยนำตัวอย่างอาหารทะเลหมัก 2 g มาโฮโมจิไนส์ด้วยน้ำกลั่น 18 mL ไตเตรทด้วย 0.1 M Silver nitrate ($AgNO_3$) โดยใช้ 10% w/v ของ Potassium chromate (K_2CrO_4) เป็น indicator

3.1.2.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) และปริมาณไตรเมทิลเอมีน (TMA)

เตรียมตัวอย่างโดยการชั่งอาหารทะเลหมัก 2 กรัม และบดตัวอย่างให้ละเอียด เติม 4 % Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 8 mL บดรวมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และ

บดเป็นระยะๆ กรองผ่านกระดาษกรองที่ละเอียด นำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 30 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณ total volatile basic nitrogen (TVB-N)

วิเคราะห์โดยใช้ Conway's dish หาปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก โดยเติม Boric acid (H_3BO_3) ลงตรงกลางจาน 1 mL ใส่ตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่ผ่านการเตรียมลงในวงแหวนรอบนอก 1 mL เติมสารละลายอิ่มตัว Potassium carbonate (K_2CO_3) 1 mL ในวงแหวนรอบนอก ปิดฝาทันที เขย่าให้สารละลายในวงแหวนรอบนอกผสมกันเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ไตเตรทสารละลายตรงกลางจานด้วย 0.02 N Hydrochloric acid (HCl) จนถึงจุดยุติคือสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู (Hasegawa, 1987) กำหนดให้ TCA 4 % จำนวน 1 mL เป็น Blank แทนสารละลายตัวอย่าง นำไปคำนวณโดยใช้สูตร

การคำนวณ TVB-N

$$\text{TVB-N (mg ไนโตรเจน/100 g ตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(A-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

N = Normality ของสารละลาย Hydrochloric acid

A = mL ของ HCl ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = mL ของ HCl ที่ใช้ไตเตรท Blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลาย TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

3.1.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณ Trimethylamine (TMA)

วิเคราะห์โดยใช้ Conway's dish เช่นเดียวกับการหาปริมาณ TVB-N โดยเติม Boric acid ลงตรงกลางจาน 1 mL ใส่ตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่ผ่านการเตรียมลงในวงแหวนรอบนอก

1 mL เติมสารละลาย 10% Formaldehyde จำนวน 1 mL ผสมกับตัวอย่าง ปิดฝาทันที เขย่าให้สารละลายในวงแหวนรอบนอกผสมกันเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไตเตรทสารละลายตรงกลางจานด้วย 0.02 N Hydrochloric acid (HCl) จนถึงจุดยุติคือสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู กำหนดให้ TCA 4 % จำนวน 1 mL เป็น Blank แทนสารละลายตัวอย่าง (Hasegawa, 1987) นำไปคำนวณโดยใช้สูตร

การคำนวณ TVB-N

$$\text{TMA-N (mg ไนโตรเจน/100 g ตัวอย่าง)} = \frac{(N)(14)(C-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

N = Normality ของสารละลาย Hydrochloric acid

C = mL ของ HCl ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = mL ของ HCl ที่ใช้ไตเตรท Blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลาย TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในรูปของฮีสตามีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมักโดยใช้ชุดทดสอบ HistaStrip™ Test Manual ซึ่งมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

เตรียมตัวอย่างจากอาหารทะเลหมัก โดยการเตรียม Enrichment Solution (1X) : ให้ผสม 1 ส่วน ของขวด Enrichment Solution (20X) เข้ากับอีก 19 ส่วน ของน้ำกลั่น ชั่งตัวอย่างมา 20 กรัม บดให้ละเอียด หลังจากนั้นแบ่งตัวอย่างมา 4 กรัม เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อน ใส่สาร Enrichment Solution จำนวน 16 mL นำไปปั่นด้วย เครื่อง Vortex ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 30 วินาที รอเวลา 1 นาที เขย่าอีก 30 วินาที รอเวลา 5 นาที เพื่อให้เศษอาหารตกลงก้นหลอด

นำ Color Solution ผสมกับ Neutralization Buffer ในอัตราส่วนเท่าๆ กัน ได้เป็นสารปฏิกิริยาผสม (Reaction Mix) เติม 40 µl ของสารปฏิกิริยาผสมลงในหลุมทดสอบ หลังจากนั้นเติมตัวอย่างอาหารทะเลหมักและตัวควบคุม (ฮีสตามีน 50 ppm) ปริมาตร 200 µl ลงไปในหลุมที่มีสารปฏิกิริยาผสม จุ่มแผ่นทดสอบลงในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำแผ่นทดสอบออกทิ้งไว้ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปอ่านเทียบกับแผ่นเทียบระดับสี

3.2 การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์และการคัดแยก histamine-forming แบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารทะเลหมัก

3.2.1 การหาปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก

นำตัวอย่างอาหารทะเลหมักมา 25 กรัม โฮโมจีไนส์เป็นเวลา 2 นาที ในสารละลาย potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0) ปริมาตร 225 มล. ทำการเจือจางตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปิเปต 1 มล. ของแต่ละระดับความเจือจางลงบนอาหาร plate count agar (PCA) ที่เติม 3% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนและรายงานในรูป $\log_{10}$ colony forming units (CFU)/g

วิเคราะห์ปริมาณ total coliform และ *Escherichia coli* ในตัวอย่างตามวิธีมาตรฐานดังนี้

การทดสอบ Presumptive test

1) นำตัวอย่างอาหารทะเลที่ระดับความเจือจาง 100 เท่า จำนวน 10 มล ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ความเข้มข้น 2 เท่า ซึ่งบรรจุหลอดจำนวน 10 มล ทำซ้ำ 3 หลอด

2) ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 มล และ 0.1 มล ลงในอาหาร LST ความเข้มข้นปกติ ซึ่งบรรจุหลอดจำนวน 10 มล ทำซ้ำที่ระดับเจือจางต่างกัน 3 ระดับ ระดับละ 3 หลอด จะได้ตัวอย่างที่ระดับ

ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01 กรัมอาหาร หากตัวอย่างเป็นอาหารที่คาดว่าปนเปื้อนมาก ปิเปตที่ระดับเจือจางที่เหมาะสม เช่น 0.01, 0.001 หรือ 0.0001 เป็นต้น

3) นำไปเพาะเชื้อที่ 35 °C ตรวจการเกิดกรดและก๊าซภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่พบนำไปเพาะเชื้อต่อจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผล

การทดสอบ Confirm test

1) นำ loop เขี่ยเชื้อจากหลอดบรรจุอาหาร LST ที่ให้ผลบวก ใส่ลงในอาหาร BGBB

2) นำไปเพาะเชื้อที่ 35 °C ตรวจการเกิดกรดและก๊าซภายใน 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ คำนวณค่า coliform bacteria จากตาราง MPN

การทดสอบ Confirm test สำหรับ *E. coli*

1) ถ่ายเชื้อจากหลอดที่บรรจุอาหาร LST ให้ผลบวกด้วย loop เขี่ยเชื้อลงในอาหาร EC

2) นำไปเพาะเชื้อที่ 44.5 ± 0.5 °C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ บันทึกผลการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

3) เขี่ยเชื้อจากหลอดบรรจุอาหาร EC ให้ผลบวก streak ลงบนอาหาร L-EMB เพื่อแยกเชื้อ แล้วนำไปเพาะเชื้อที่ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.2.2 การคัดแยก histamine-forming แบคทีเรีย

นำตัวอย่างอาหารทะเลหมักจำนวน 0.1 mL เกลี่ยลงบนอาหาร Niven agar (Niven et al.,1981) ที่ประกอบไปด้วย 0.5% tryptone, 0.5% Yeast extract, 2% L-histidine monohydrochloride, 0.5% NaCl, 0.1% $CaCO_3$, 2.0% agar และ 0.006% bromocresol purple (pH 5.3) บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 35°C เลือกโคโลนีที่เป็นสีน้ำเงินหรือม่วง ไป streak ลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

สำหรับการวิเคราะห์การสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่คัดแยกได้ จะทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว Trypticase soy broth (TSB) ที่มีการเติม 1% L-histidine และ 3% NaCl (TSBH) บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C ไม่ต้องเขย่า หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 mL ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮีสตามีนด้วยชุดวิเคราะห์หาปริมาณฮีสทามีน Veratox® ที่ใช้หลักการของ ELISA โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบผสมกับ conjugate แล้วย้ายลงใน Antibody-coated wells ส่วนผสมที่ประกอบด้วย Free Toxin (สารพิษในตัวอย่างที่สกัดออกมา) และ conjugate (สารพิษติดกับ enzyme) จะถูกจับด้วยแขนของ Antibody สารที่ไม่ถูกจับด้วยแขนของ Antibody จะถูกล้างออก หลังจากเติม Substrate สีฟ้าจะเริ่มปรากฏขึ้น จากการทำปฏิกิริยาของ Enzyme กับ Substrate สุดท้ายเติม Red stopping นำไปอ่านค่าการดูดกลืนของแสงที่ 650 nm เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยคำนวณค่าความเข้มข้นในหน่วย ppm ถ้าตัวอย่างที่ทดสอบมีสีน้ำเงินเข้มแสดงว่ามีฮีสตามีนน้อย แต่ถ้าตัวอย่างที่ทดสอบมีสีแดงแสดงว่ามีฮีสตามีนมาก

3.2.2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้

นำเชื้อ Histamine-forming bacteria ที่คัดแยกมาทำการย้อมแกรม และศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 การศึกษาผลของ NaCl ต่อการสร้าง Histamine ของเชื้อที่คัดแยกได้

คัดเลือกเชื้อที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.2 ที่มีความสามารถในการสร้างฮีสตามีนสูงสุดมา 3 isolates ในการศึกษาผลของ NaCl ต่อการสร้างฮีสตามีน โดยเตรียมอาหาร TSBH ปริมาตร 50 mL ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ เตรียมหัวเชื้อโดยการนำเชื้อที่คัดแยกได้ปริมาตร 100 µL ใส่ลงในอาหาร TSBH ที่เติมเกลือ NaCl 3% บ่มที่อุณหภูมิ 35°C จนได้เชื้อเริ่มต้นที่ 6.0logCFU/ml เติมหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ระดับต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ

35°C วิเคราะห์ปริมาณ Histamine ที่เชื้อผลิตขึ้นที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ตามวิธีการเดียวกับข้อ 3.2.2

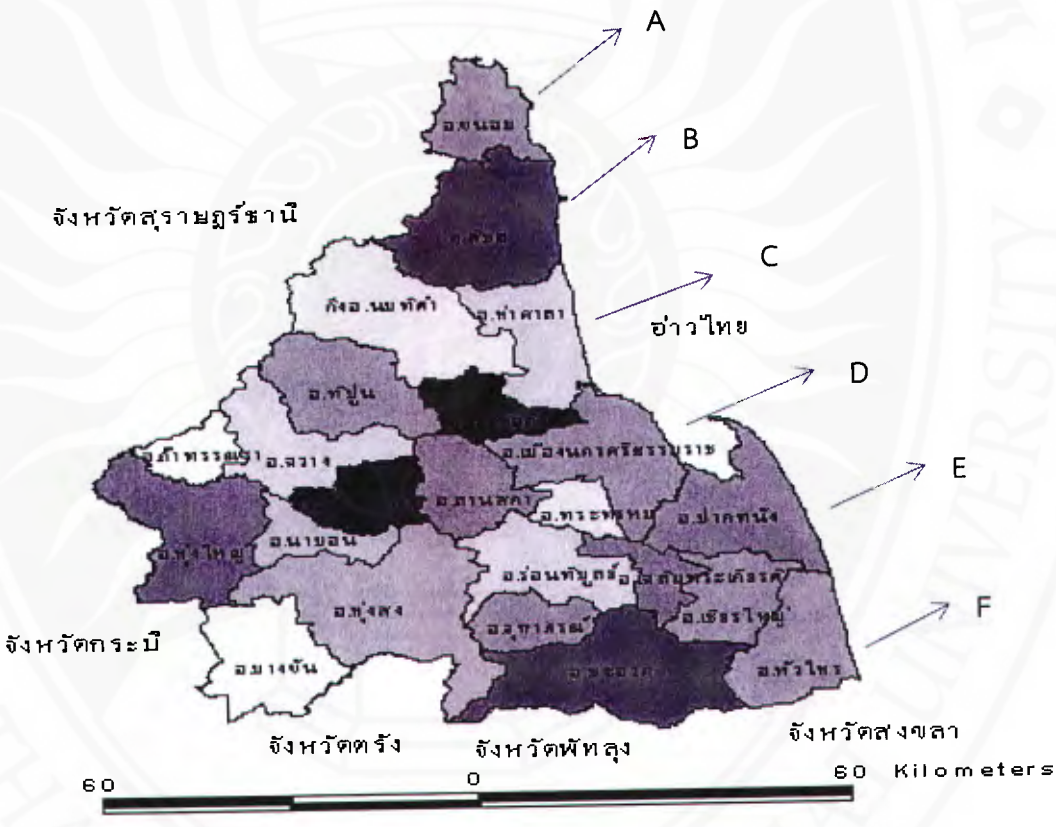
ทุกการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ และแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.)

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่าง

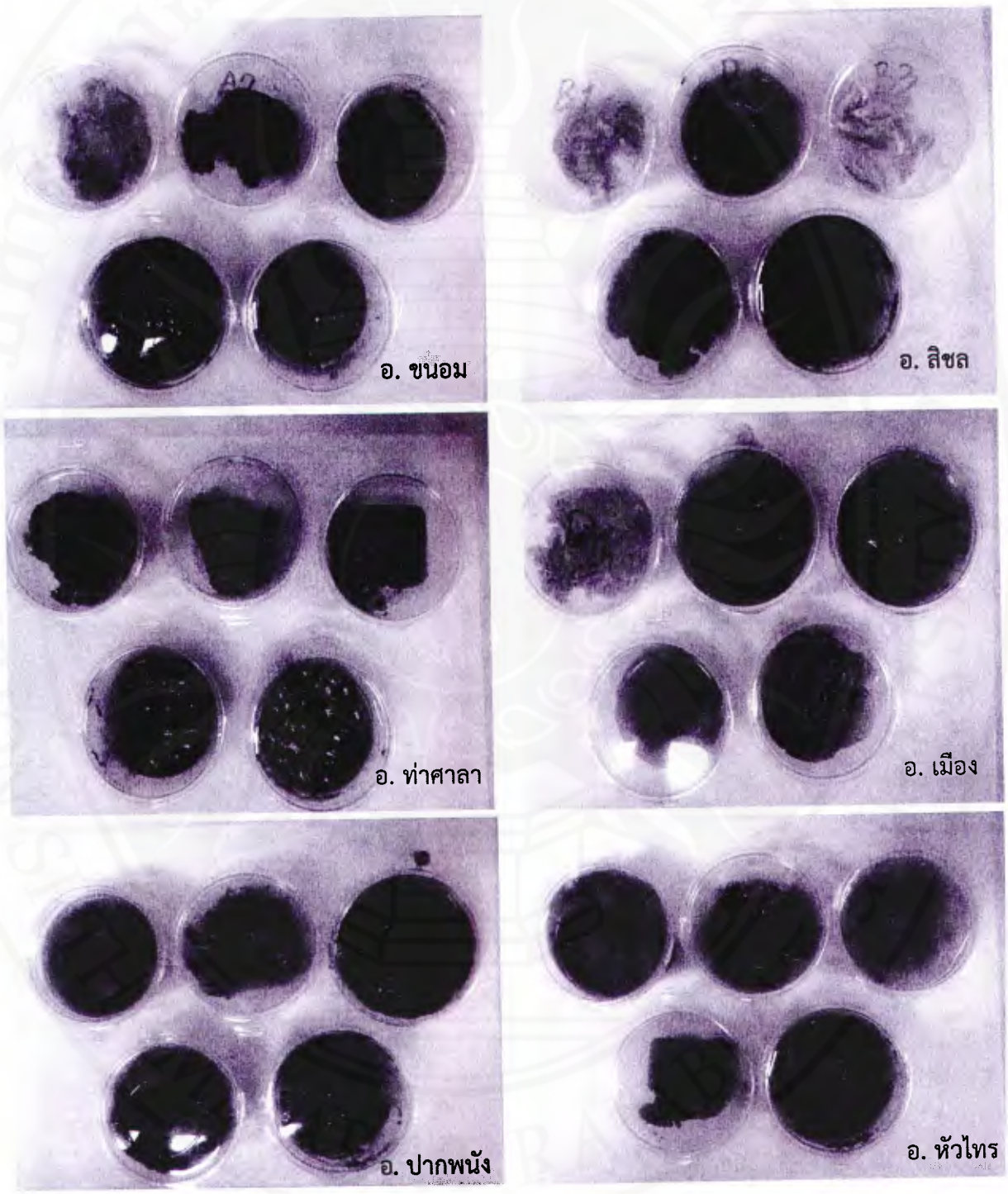
จากการลงพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลหมักในเขตพื้นที่อำเภอ 6 อำเภอที่ติดกับทะเลอ่าวไทยของจังหวัดนครศรีธรรมราช ได้แก่ อำเภอขนอม อำเภอสิชล อำเภอท่าศาลา อำเภอเมือง อำเภอปากพนัง และอำเภอหัวไทร จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยกำหนดรหัสพื้นที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง 6 อำเภอ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช

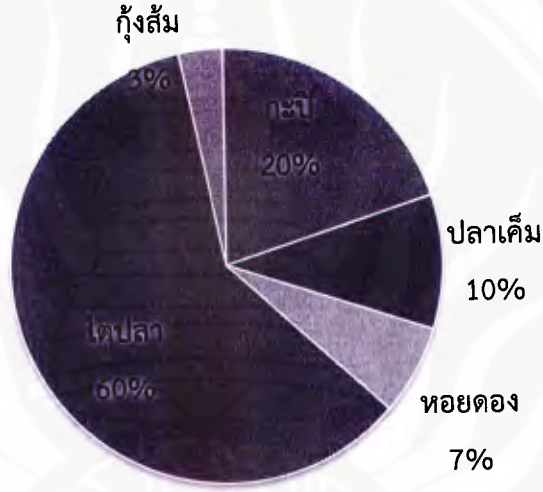
ที่มา: http://www.brrd.in.th/ricemap/data/Nakhon_Si_Thammarat/1.jpg

โดยสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักระหว่างช่วงเดือน เมษายน – มิถุนายน 2557 อำเภอละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วยผลิตภัณฑ์ไตปลา กะปิ กุ้งส้ม หอยดอง และปลาเค็ม ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่ใช้ในการศึกษา

จากรูปที่ 4.2 เมื่อนำมาจำแนกประเภทของตัวอย่างออกเป็นกลุ่มๆ พบว่า 60% ของตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นผลิตภัณฑ์ไตปลาหมัก 20% เป็นผลิตภัณฑ์กะปิ 10% เป็นผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม 7% เป็นผลิตภัณฑ์หอยดอง และ 3% เป็นผลิตภัณฑ์กุ้งส้ม (ดังแสดงในรูปที่ 4.3)



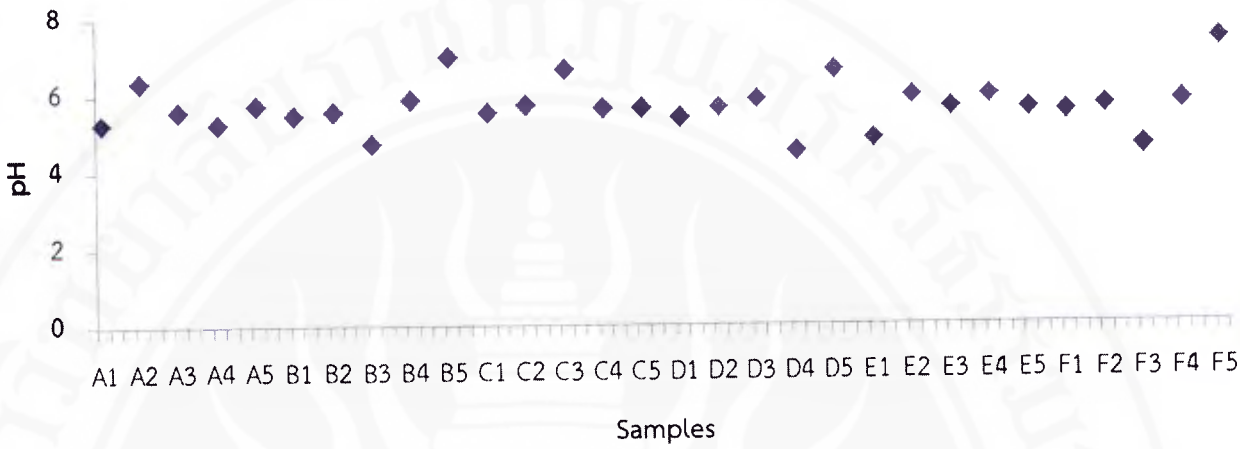
รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นการจำแนกประเภทของตัวอย่างอาหารทะเลหมักที่ใช้ในการศึกษา

จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 30 ตัวอย่าง ไปทำการวิเคราะห์หาค่า pH ปริมาณเกลือ total volatile basic nitrogen (TVBN) Trimethyamine (TMA) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณ total coliform และ *Escherichia coli* และทำการคัดแยกเชื้อ histamine-forming bacteria ในขั้นตอนต่อไป

4.2 ผลการวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณเกลือ total volatile basic nitrogen (TVB-N) และ Trimethylamine (TMA) ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

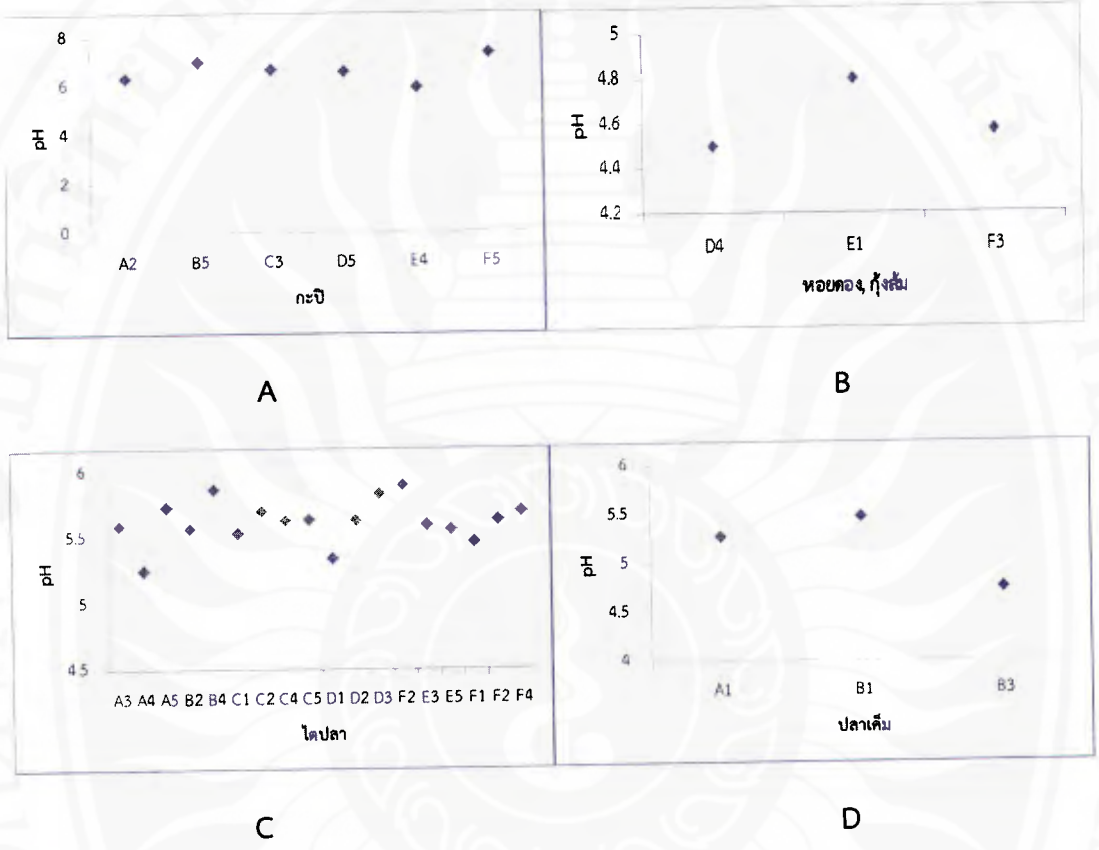
4.2.1 ผลการวิเคราะห์ค่า pH

จากการวิเคราะห์ค่า pH ของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าค่า pH ของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 4-7 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.67±0.63 ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ค่า pH ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาตามประเภทของผลิตภัณฑ์โดยนำผลการวิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.1080-2535) ที่กำหนดไว้ให้ในผลิตภัณฑ์กะปิมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.5-7.8 ผลิตภัณฑ์หอยดองและกุ้งส้มเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน พ.ศ. 2546 ได้กำหนดระดับค่า pH ไว้ที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ไตปลาเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กำหนดระดับค่า pH ไว้ที่ระหว่าง 5-6 และในผลิตภัณฑ์ปลาเค็มไม่ได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานของระดับค่า pH ไว้ พบว่าค่า pH โดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์กะปิ มีค่าเท่ากับ 6.61±0.19 ในขณะที่ค่า pH โดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์หอยดองและกุ้งส้ม มีค่าเท่ากับ 4.62±0.09 ค่า pH โดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไตปลา มีค่าเท่ากับ 5.62±0.04 และ ค่า pH โดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม มีค่าเท่ากับ 5.16±0.22 ตามลำดับ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักทั้งหมดที่นำมาทำการทดสอบในครั้งนี้ค่า pH ส่วนใหญ่อยู่ในระดับที่เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ค่า pH ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักแยกตามประเภทของผลิตภัณฑ์

A: ค่า pH ในผลิตภัณฑ์กะปิ

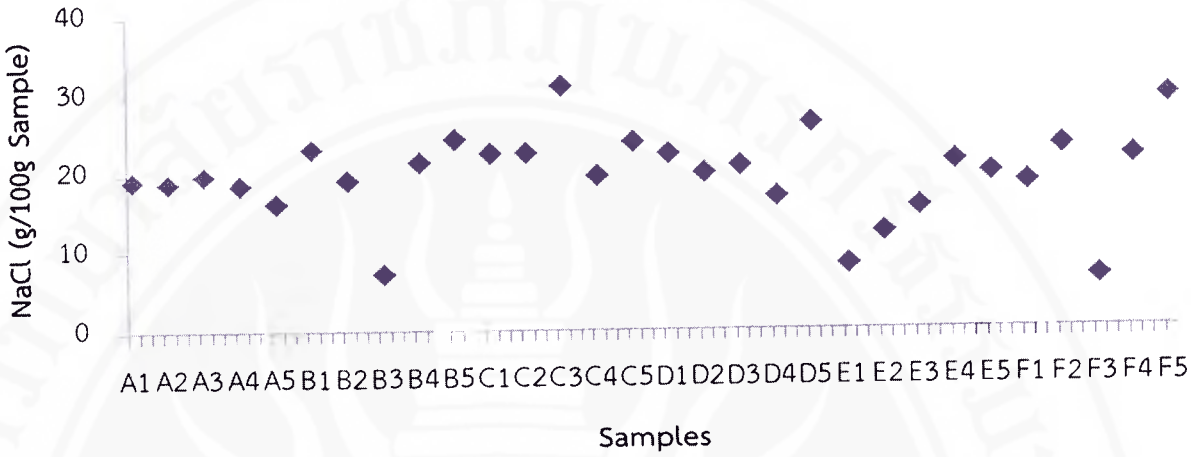
B: ค่า pH ในผลิตภัณฑ์หอยดองและกุ้งส้ม

C: ค่า pH ในผลิตภัณฑ์ไตปลา

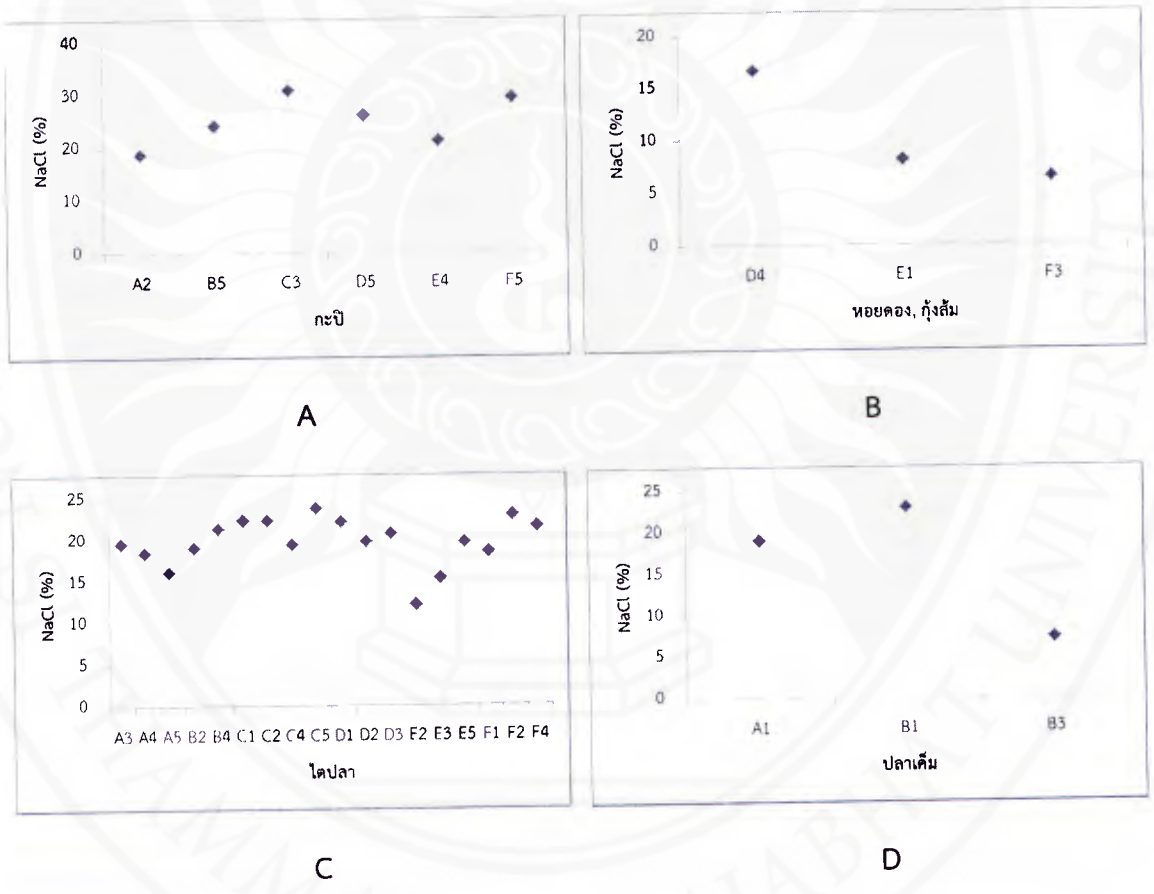
D: ค่า pH ในผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเกลือของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณเกลือของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 5-30% โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 19.56±5.62 % ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และเมื่อพิจารณาตามประเภทของผลิตภัณฑ์โดยนำผลการวิเคราะห์ปริมาณเกลือที่ได้ไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนที่กำหนดไว้ให้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังนี้ เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนดให้ในผลิตภัณฑ์กะปีมีปริมาณเกลือไม่น้อยกว่า 36% ผลิตภัณฑ์หอยดองและกุ้งส้ม เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กำหนดให้มีปริมาณเกลือไม่น้อยกว่า 3.5% ผลิตภัณฑ์ไตปลาเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กำหนดให้มีปริมาณเกลือไม่น้อยกว่า 12% และในผลิตภัณฑ์ปลาเค็มเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กำหนดให้มีปริมาณเกลือไม่น้อยกว่า 10% พบว่าปริมาณเกลือโดยเฉลี่ยในตัวอย่างผลิตภัณฑ์กะปี มีค่าเท่ากับ 25.07±1.89% ในขณะที่ปริมาณเกลือโดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์หอยดองและกุ้งส้ม มีค่าเท่ากับ 10.40±3.19% ปริมาณเกลือ โดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไตปลา มีค่าเท่ากับ 19.77±0.69% และปริมาณเกลือโดยเฉลี่ยของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม มีค่าเท่ากับ 16.43±4.75 ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าในผลิตภัณฑ์กะปีส่วนใหญ่ปริมาณเปอร์เซ็นต์เกลือในผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนที่กำหนด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความต้องการของผู้บริโภคที่นิยมผลิตภัณฑ์กะปีที่มีความเค็มไม่มาก ส่งผลให้ผู้ผลิตปรับลดปริมาณเกลือในกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามในผลิตภัณฑ์ประเภทอื่นๆ ปริมาณเกลืออยู่ในระดับที่เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.6 ปริมาณเกลือในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง

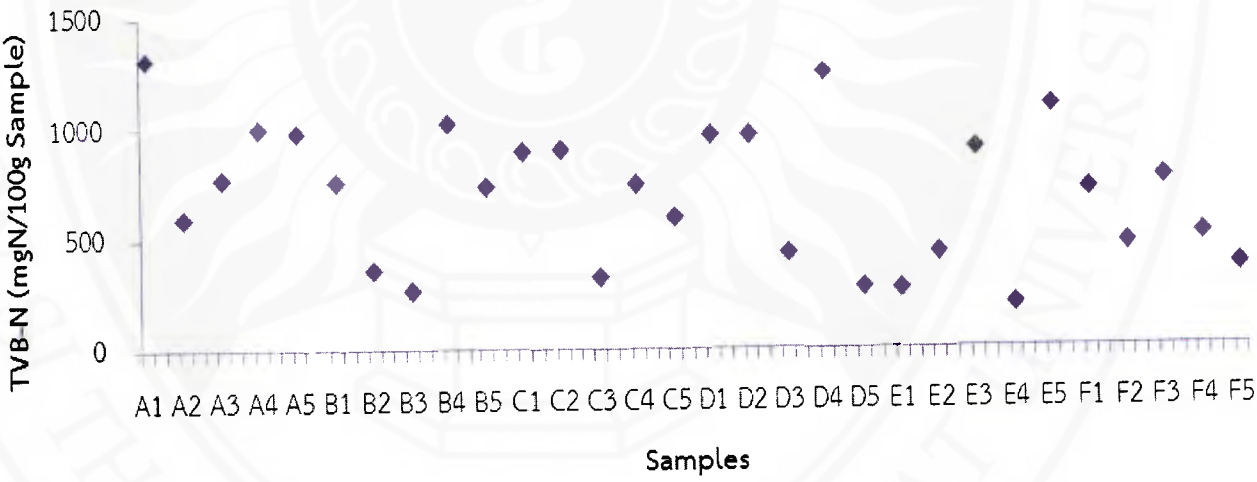


รูปที่ 4.7 ปริมาณเกลือในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักแยกตามประเภทของผลิตภัณฑ์

A: ผลิตภัณฑ์กะปิ B: ผลิตภัณฑ์หอยดองและกุ้งส้ม C: ผลิตภัณฑ์ไตปลา และ D: ผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ TVB-N

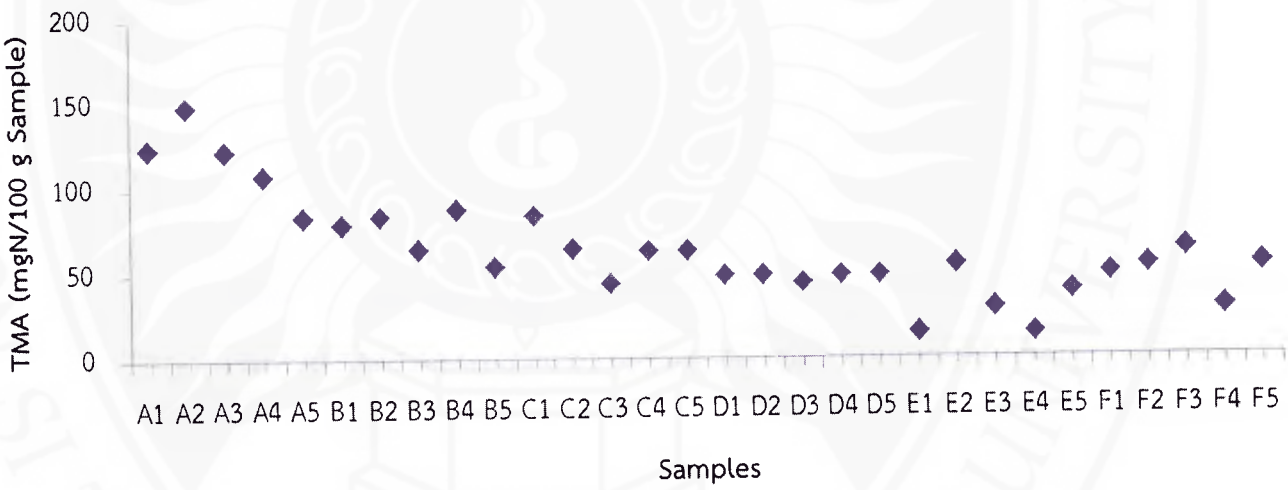
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ TVB-N ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 200-1,300 mgN/100g ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 697.53±26.05 mgN/100g ตัวอย่าง (ดังแสดงในรูปที่ 4.8) ทั้งนี้ปริมาณ TVB-N ไม่ได้ถูกกำหนดไว้ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก เนื่องจากเป็นปริมาณ TVB-N เป็นดัชนีที่ใช้บอกความสดของผลิตภัณฑ์ ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการกำหนดค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้ อย่างไรก็ตามปริมาณ TVB-N คือปริมาณด่างที่ระเหยได้ซึ่งหมายรวมถึงปริมาณไนโตรเจนที่มีในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณ TVB-N จึงถูกนำมาทดสอบเพื่อให้ทราบถึงปริมาณไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ โดยปริมาณ TVB-N จะสัมพันธ์กับปริมาณฮีสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C (Al-Busaidi et al., 2011)



รูปที่ 4.8 ปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง

4.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ TMA

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ TMA ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ TMA ในตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 14-150 mgN/100g ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 64.02±5.72 mgN/100g ตัวอย่าง โดยพบปริมาณ TMA สูงที่สุดในผลิตภัณฑ์รหัส A2 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์กะปิ สำหรับปริมาณ TMA เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยน Trimethylamine oxide (TMAO) ด้วยเอนไซม์ trimethylamine oxidase จากปฏิกิริยารีดักชันของแบคทีเรีย ไปเป็น TMA ซึ่งพบมากในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriacae (Sikorski, 1990) ซึ่งปริมาณ TMA ที่พบในผลิตภัณฑ์สามารถบ่งบอกถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriacae ได้ สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณ TMA แสดงดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ปริมาณ TMA ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในรูปของฮีสตามีน โดยใช้ชุดทดสอบ HistaStrip™ Test Manual ในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก 30 ตัวอย่าง แสดงผลในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณฮีสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

รหัสตัวอย่าง	ปริมาณฮีสตามีน (ppm)	รหัสตัวอย่าง	ปริมาณฮีสตามีน (ppm)
A1	25-50	D1	25-50
A2	25-50	D2	0-25
A3	0-25	D3	25-50
A4	0-25	D4	25-50
A5	0-25	D5	0-25
B1	75-100	E1	0-25
B2	25-50	E2	25-50
B3	0-25	E3	75-100
B4	0-25	E4	50-75
B5	0-25	E5	25-50
C1	25-50	F1	25-50
C2	25-50	F2	0-25
C3	25-50	F3	25-50
C4	0-25	F4	50-75
C5	25-50	F5	0-25

จากตารางที่ 4.1 พบว่าในตัวอย่างรหัส A3 A4 A5 B3 B4 B5 C4 D2 D5 E1 F2 และ F5 มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0 – 25 ppm ในตัวอย่างรหัส A1 A2 B2 C1 C2 C3 C5 D1 D3 D4 E2 E5 F1 และ F3 มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 25 – 50 ppm ตัวอย่างรหัส E4 และ F4 มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 50 – 75 ppm และในตัวอย่างรหัส B1 และ E3 มีปริมาณฮีสตามีนสูงสุดอยู่ในช่วง 75 – 100

ppm โดยรหัสตัวอย่าง B1 เป็นผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม และตัวอย่างรหัส E3 เป็นผลิตภัณฑ์ไตปลา การสร้างสารพิษฮีสตามีนในอาหารที่มีแหล่งโปรตีน เกิดจากแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารมีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างเอนไซม์ Decarboxylase ย่อยสลายกรดอะมิโนฮีสติดีน (Histidine) โดยการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลของฮีสติดีน ได้เป็นฮีสตามีนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (วงศ์ทิพา โรจนประภพ, 2551) เมื่อบริโภคอาหารที่มีระดับของฮีสตามีนสูง จะมีผลทำให้เกิดอาการแพ้ ที่เรียกว่า สคอมโบรทอกซิโคซิส (Scombrotoxicosis) อย่างไรก็ตามปริมาณฮีสตามีนที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ยังคงอยู่ในระดับต่ำ ทั้งนี้ในผลิตภัณฑ์น้ำปลา ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 500 ppm ยกเว้นประเทศแคนนาดา ที่กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm หรือในผลิตภัณฑ์ปลาทูเค็ม ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm ในปี ค.ศ. 2012 Zhai และคณะ ทำการศึกษาปริมาณไบโอเจนิกเอมีน 8 ชนิด (histamine, tryptamine, putrescine, 2-phenylethylamine, cadaverine, tyramine, spermidine และ spermine) ในตัวอย่างปลา 13 ชนิด และในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลา 49 ชนิด ที่นิยมรับประทานทางตอนใต้ของจีน พบว่าปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างปลา อยู่ในช่วง 5.03 – 156.17 mg/kg โดยมีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่า 21.85 mg/kg และพบปริมาณไบโอเจนิกเอมีนสูงในผลิตภัณฑ์ปลาหมักและปลาบรรจุถุง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์ lightly cured horse mackerel พบปริมาณ 2-phenylethylamine เท่ากับ 57.61 mg/kg cadaverine เท่ากับ 244.41 mg/kg และมีปริมาณ tyramine เท่ากับ 62.85 mg/kg

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด total coliform และ *Escherichia coli* ในตัวอย่างอาหารทะเลหมัก

ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักทั้ง 30 ตัวอย่าง โดยวิธี spread plate บนอาหาร PCA จากการทดลองพบว่าตัวอย่าง B3 (ผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม) มีปริมาณจุลินทรีย์

ทั้งหมดสูงที่สุดอยู่ที่ 8.8 x 10^6 CFU/g รองลงมาคือตัวอย่าง D1 และ C2 (ผลิตภัณฑ์ไตปลา) ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 5.8 x 10^5 และ 5.7 x 10^5 CFU/g ตามลำดับ (แสดงผลดังตารางที่ 4.2)

และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ Total coliform และ *E. coli* ตามวิธีมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ F5 (ผลิตภัณฑ์กะปิ) มีปริมาณ Total coliform สูงที่สุด และพบเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ A2, A4, B3 และ F5 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

รหัสตัวอย่าง	Total bacteria (CFU/g)	รหัสตัวอย่าง	Total bacteria (CFU/g)
A1	1.0 X 10^4	D1	5.8 X 10^5
A2	9.7 X 10^4	D2	>30
A3	>30	D3	5.5 X 10^4
A4	1.0 X 10^4	D4	1.9 X 10^4
A5	1.0 X 10^3	D5	5.4 X 10^4
B1	6.2 X 10^3	E1	>30
B2	3.0 X 10^3	E2	4.7 X 10^3
B3	8.8 X 10^6	E3	>30
B4	5.5 X 10^3	E4	1.4 X 10^5
B5	7.1 X 10^3	E5	>30
C1	5.7 X 10^5	F1	>30
C2	2.7 X 10^3	F2	>30
C3	8.0 X 10^3	F3	>30
C4	3.1 X 10^3	F4	>30
C5	>30	F5	4.7 X 10^4

ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักอาจเป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียแลกติก โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตสารต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ เอนไซม์ สารให้กลิ่นรส และสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ต้องการในระหว่างกระบวนการผลิต ดังนั้นปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในตัวอย่างที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จึงมิได้บ่งบอกถึงอันตรายในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ Total coliform ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

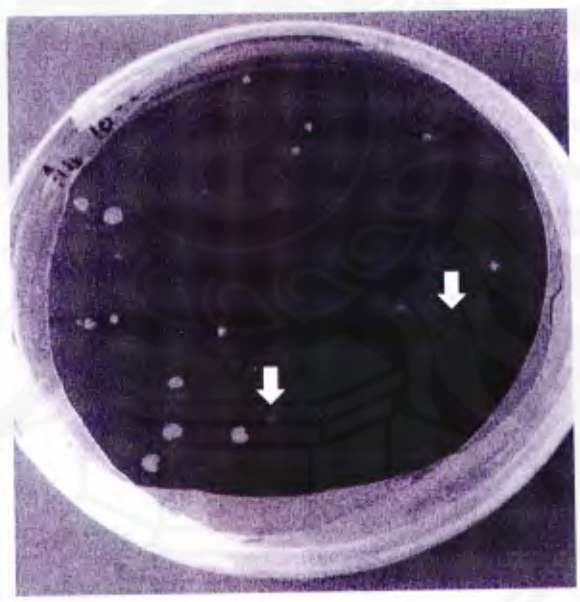
รหัสตัวอย่าง	Total coliform (MPN index/100ml)	**รหัสตัวอย่าง**	Total coliform (MPN index/100ml)
A1	3	D1	21
A2*	23	D2	3
A3	3	D3	3
A4*	240	D4	3
A5	3	D5	3
B1	9	E1	23
B2	3	E2	240
B3*	43	E3	3
B4	3	E4	4
B5	23	E5	3
C1	3	F1	3
C2	3	F2	3
C3	4	F3	3
C4	3	F4	3
C5	3	F5*	1,100

หมายเหตุ: * คือ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พบเชื้อ *E. coli* ในขั้นการยืนยันผล

4.5 ผลการคัดแยก Histamine forming bacteria และผลการวิเคราะห์การสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่คัดแยกได้

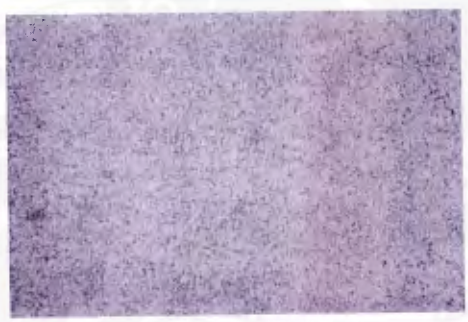
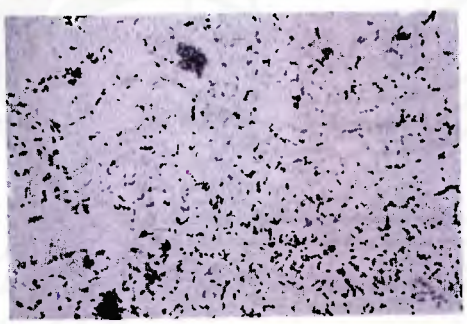
4.5.1 ผลการคัดแยก Histamine forming bacteria

จากการคัดแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Niven agar ที่มีการเติม 1% L-histidine และ 5% NaCl และทำการคัดแยกโคโลนีที่เป็นสีน้ำเงินอมม่วงหรือสีชมพู (ดังแสดงในรูปที่ 4.10) ไป streak ลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากการทดลองคัดแยกเชื้อ Histamine forming bacteria จากตัวอย่างอาหารทะเลหมักจำนวน 30 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 27 isolates โดยรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยกได้แสดงดังตารางที่ 4.4

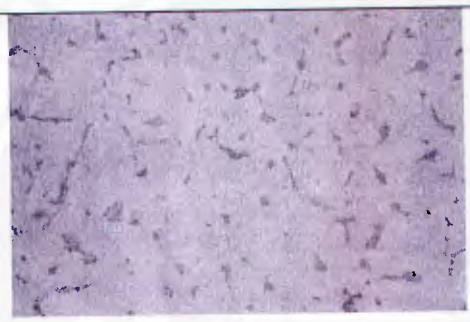
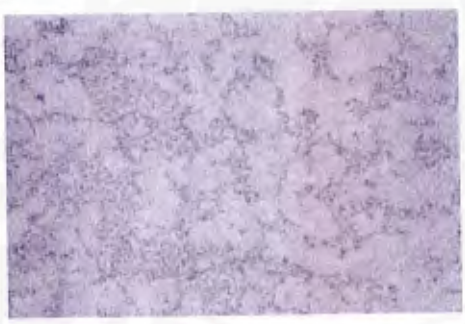


รูปที่ 4.10 ลักษณะเชื้อ histamine-forming bacteria (โคโลนีสีน้ำเงินอมม่วงหรือสีชมพู) ที่ทำการคัดแยกจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

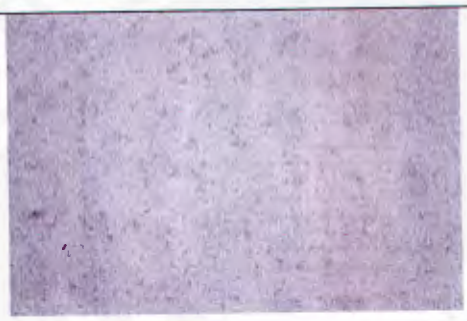
ตารางที่ 4.4 รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

รหัส isolate	ลักษณะของแบคทีเรีย	รูปร่าง	การติดสีแกรม
A11		short rod	negative
A12		rod	negative
A13		short rod	negative
A14		rod	positive

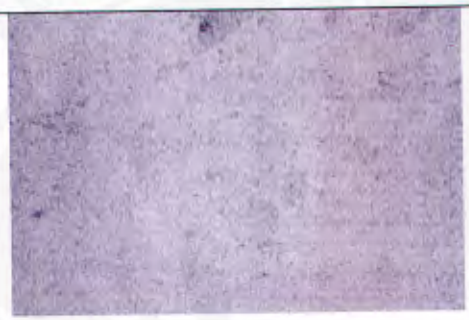
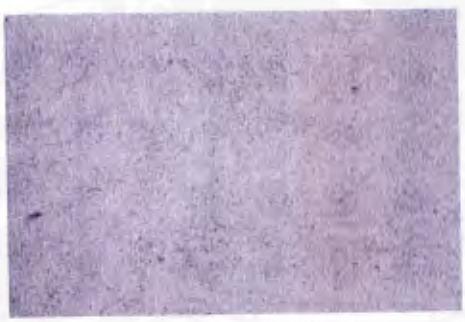
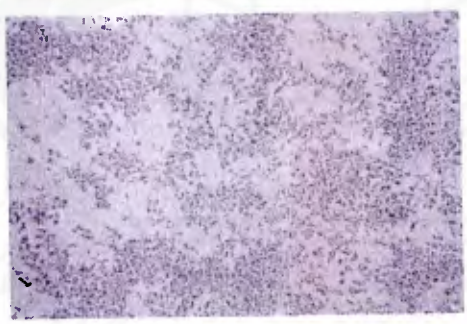
ตารางที่ 4.4(ต่อ) รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

รหัส isolate	**ลักษณะของแบคทีเรีย**	**รูปร่าง**	**การติดสีแกรม**
A15		cocci	negative
A16		cocci	positive
A17		diplococci	negative
A18		rod	negative

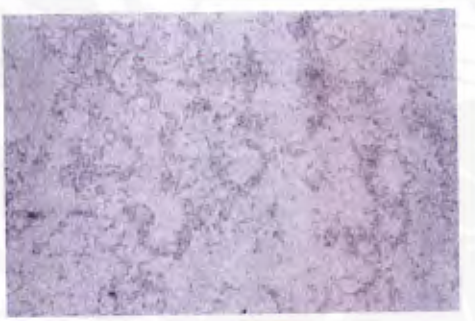
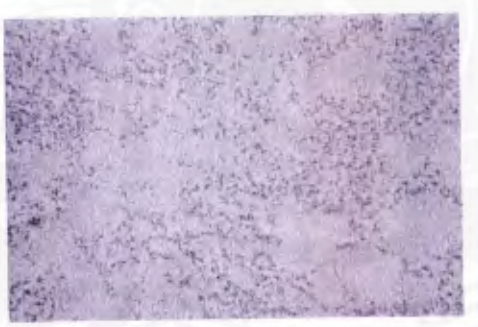
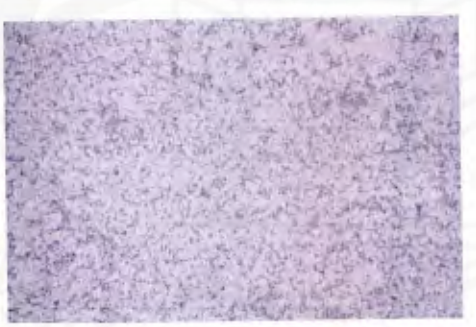
ตารางที่ 4.4(ต่อ) รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

รหัส isolate	**ลักษณะของแบคทีเรีย**	**รูปร่าง**	**การติดสีแกรม**
A110		cocci	negative
A41		cocci	negative
A42		rod	negative
A43		short rod	negative

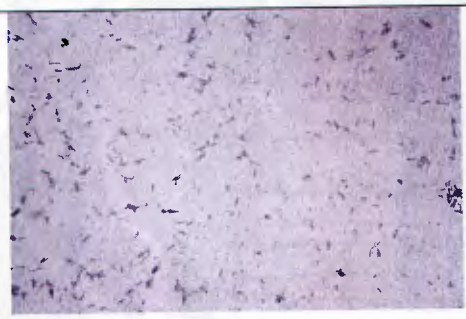
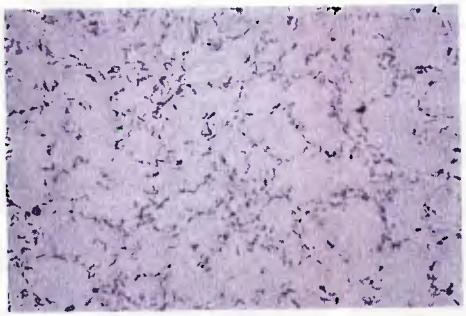
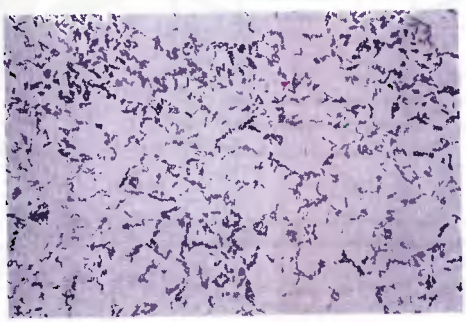
ตารางที่ 4.4(ต่อ) รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

รหัส isolate	ลักษณะของแบคทีเรีย	รูปร่าง	การติดสีแกรม
A44		short rod	negative
A45		short rod	negative
A46		short rod	negative
A47		rod	positive

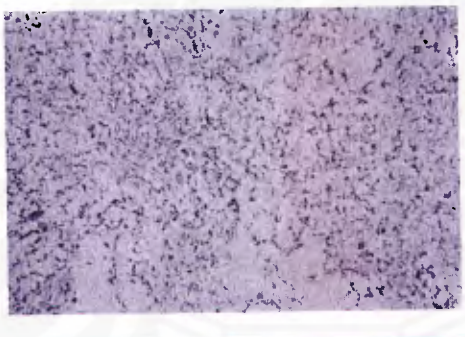
ตารางที่ 4.4(ต่อ) รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

รหัส isolate	ลักษณะของแบคทีเรีย	รูปร่าง	การติดสีแกรม
A48		rod	negative
A49		rod	negative
A410		rod	negative
A412		short rod	negative

ตารางที่ 4.4(ต่อ) รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

รหัส isolate	ลักษณะของแบคทีเรีย	รูปร่าง	การติดสีแกรม
A51		rod	positive
A52		rod	negative
B21		diplococci	negative
B22		rod	negative

ตารางที่ 4.4(ต่อ) รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อที่คัดแยก 27 isolates

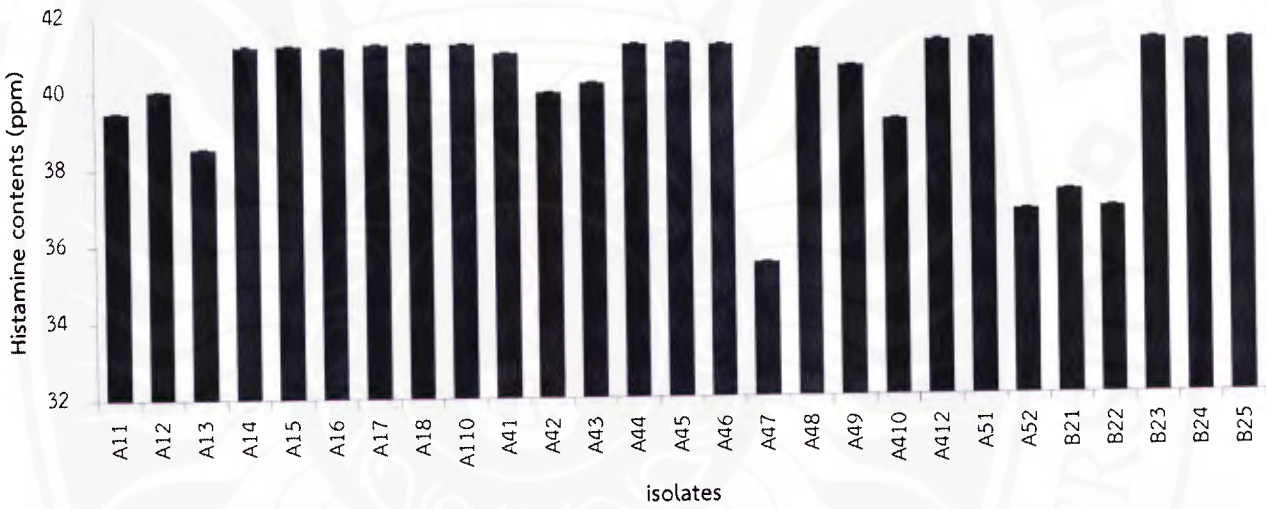
รหัส isolate	ลักษณะของแบคทีเรีย	รูปร่าง	การติดสีแกรม
B23		rod	negative
B24		rod	negative
B25		rod	positive

จากเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 27 isolates พบว่ามีรูปร่างเป็นทั้งแบบ cocci diplococci rod และ short rod โดยมีแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก (positive) ทั้งสิ้น 5 isolates (A14 A16 A47 A51 และ B25) และติดสีแกรมลบ (negative) ทั้งสิ้น 22 isolates (A11 A12 A13 A15 A17 A18 A110 A41 A42 A43 A44 A45 A46 A48 A49 A4110 A412 A52 B21 B22 B23 และ B24) หลังจากนั้นนำเชื้อที่คัดแยก

ได้ไปทำการวิเคราะห์การสร้างฮีสตามีน โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว TSB ที่มีการเติม 1% L-histidine และ 3% NaCl (TSBH) บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35°C ให้ผลดังแสดงในข้อที่ 4.5.2

4.5.2 ผลการวิเคราะห์การสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่คัดแยกได้

จากการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนของเชื้อทั้ง 27 isolates พบว่า isolates A18 A412 และ A51 สามารถสร้างฮีสตามีนในสูงสุด อยู่ที่ระดับ 41.26±0.02 – 41.29±0.02 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ปริมาณฮีสตามีนที่สร้างขึ้นในอาหาร TSBH ของเชื้อที่คัดแยกได้ ทั้ง 27 isolates

จากรูปที่ 4.11 ปริมาณฮีสตามีนที่เชื้อที่คัดแยกทั้ง 27 isolates สร้างขึ้นอยู่ในช่วงระหว่าง 35.49±0.01 - 41.29±0.02 ppm ตามลำดับ โดย isolate A47 ผลิตฮีสตามีนได้ต่ำสุดในอาหาร TSBH เช่นเดียวกับ ศิริรัตน์ ตันไสว (2547) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแลกติกแบคทีเรียจำนวน 251 isolates จากตัวอย่างอาหารหมักไทย 33 ตัวอย่าง พบว่ามี 115 isolates ที่เจริญที่อุณหภูมิ 45 °C และมีเพียง 16 isolates ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสไปทดสอบความสามารถใน

การสังเคราะห์ไบโอเจนิกเอมีน พบว่าแลกติกแบคทีเรีย 3 isolates คือ *Lactobacillus* sp. H2 H5 และ H15 แสดงความสามารถในการสร้าง Histamine และ 4 isolates คือ *Lactobacillus* sp. R1 และ R2 และ *Enterococcus* sp. AC2 และ AC3 แสดงความสามารถในการสร้าง tyramine ได้ ในขณะที่ Lin และคณะ (2012) ได้ทำการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลหมักเกลือจำนวน 57 ตัวอย่าง (ผลิตภัณฑ์ปลา, หอย และกุ้งหมัก) จากหมู่บ้านประมงในประเทศไต้หวัน และสามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิต histamine ได้ 78.5 ppm ในอาหาร trypticase soy broth (TSB) ที่เติม 1% L-histidine (TSBH) โดยสามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus megaterium* ซึ่งเชื้อ *B. megaterium* เป็นเชื้อที่ทนเค็มได้ดี

คัดเลือก isolates A18 A412 และ A51 ซึ่งให้ปริมาณฮีสตามีนสูงสุดไปทำการศึกษาผลของ NaCl ต่อการสร้าง Histamine ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBH ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ โดยให้ผลการศึกษาดังแสดงในข้อ 4.6

4.6 ผลของปริมาณ Sodium chloride (NaCl) ต่อการสร้าง Histamine ของเชื้อที่คัดแยกได้

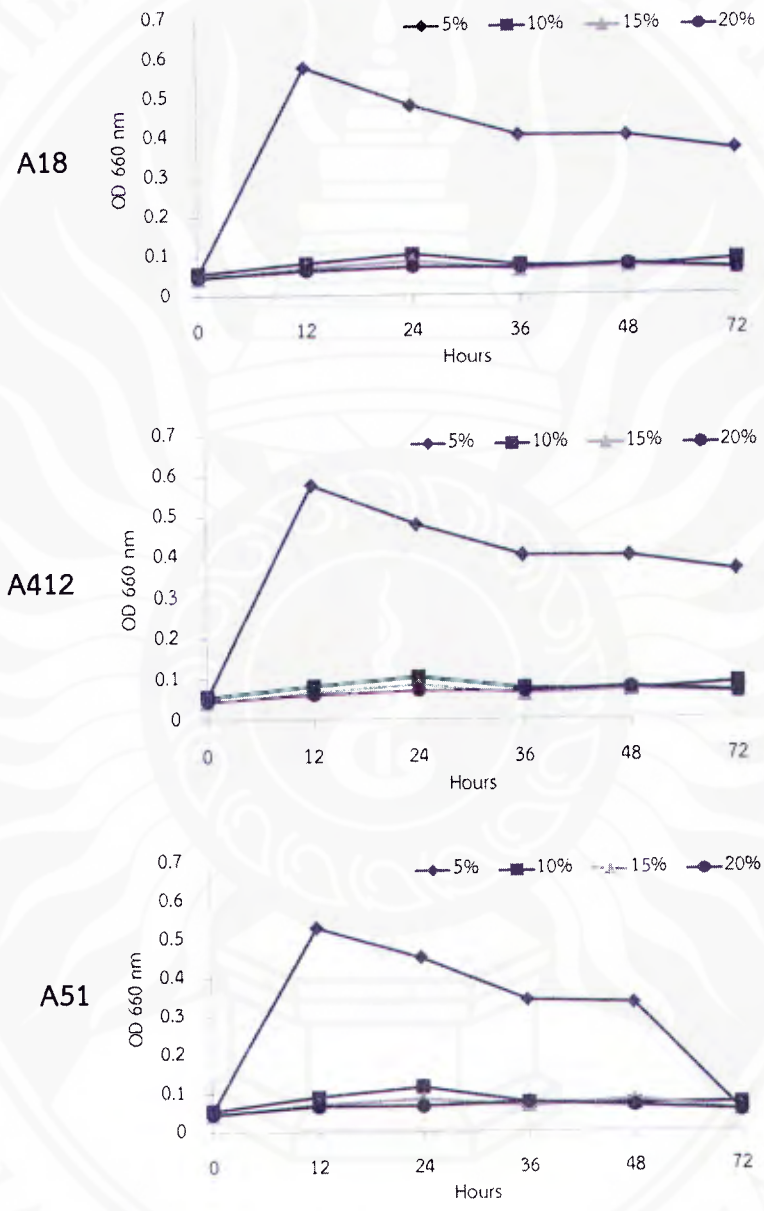
4.6.1 ผลของ NaCl ต่อการเจริญของเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อ isolate A18 A412 และ A51 ในอาหาร TSBH ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ พบว่าทุก isolates สามารถเจริญได้ดีที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 5% ที่ 12 ชั่วโมง และค่อยๆ ลดการเจริญลงจนถึง 72 ชั่วโมงของการทดลอง ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป ทุก isolates สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง และค่อยๆ ลดการเจริญลงจนถึง 72 ชั่วโมงของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.12

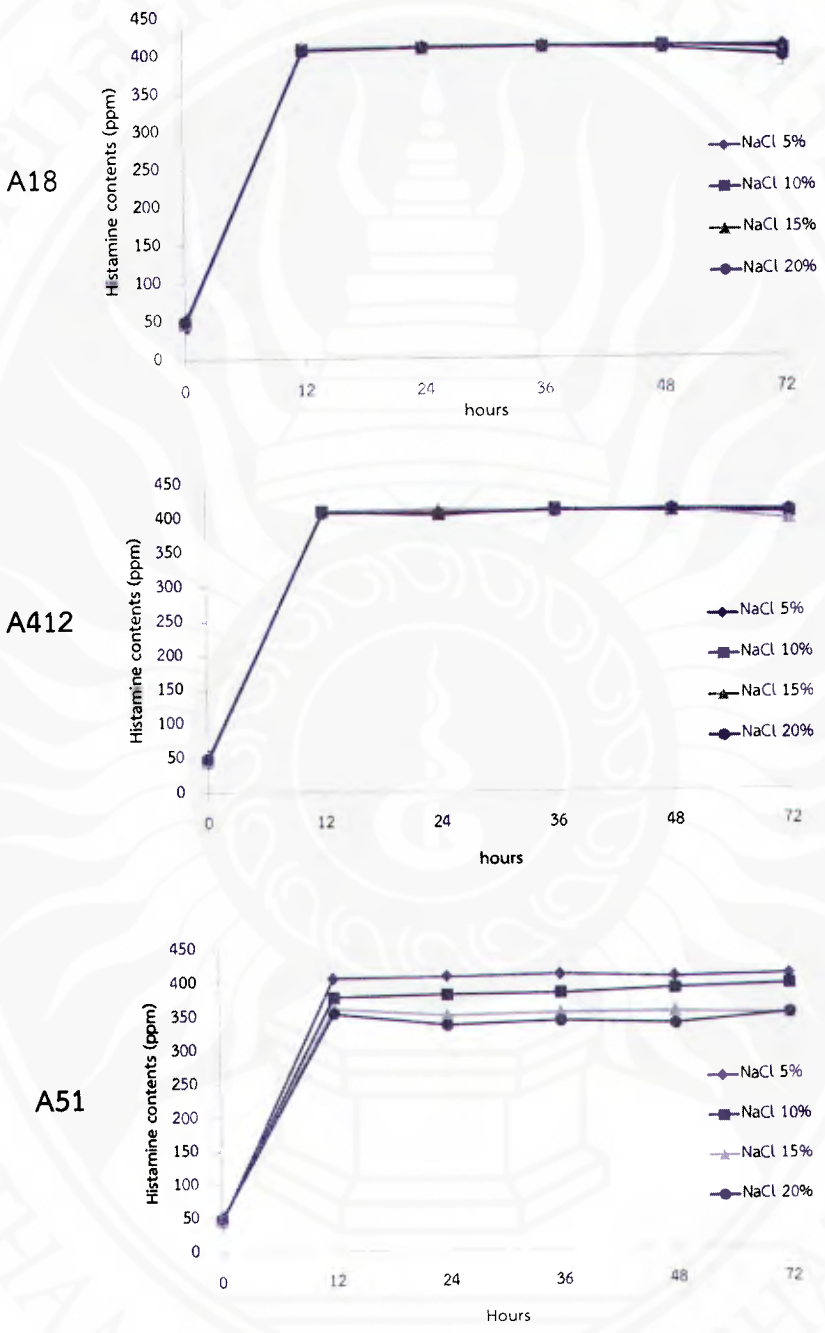
4.6.2 ผลของ NaCl ต่อการสร้าง Histamine ของเชื้อ

จากการทดลองผลของ NaCl ต่อการสร้างปริมาณฮีสตามีนของ isolates A18 A412 และ A51 พบว่าปริมาณ NaCl ตั้งแต่ 5 – 20% ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างฮีสตามีน โดย isolate A18 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุดเท่ากับ 411.27±0.09 ppm isolate A412 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุด

เท่ากับ 411.62±0.11 ppm และ isolate A51 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุดเท่ากับ 410.03±0.18 ppm ที่ 36 ชั่วโมงในทุก isolates ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.12 การเจริญของเชื้อทั้ง 3 isolates ในอาหาร TSBH ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.13 การสร้างฮีสตามีนของเชื้อทั้ง 3 isolates ในอาหาร TSBH ที่มีการเติม NaCl ที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 72 ชั่วโมง

การยับยั้งการสร้างฮีสตามีนสามารถทำได้หลายวิธี อาทิ การฉายรังสี และการใช้จุลินทรีย์มาย่อยสลายฮีสตามีน จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนจะอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีหน้าที่หลักในการหมักผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก แบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง และแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีความเข้มข้นของเกลือไม่สูง ส่วนราก็เป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทในการลดปริมาณฮีสตามีน แต่ยังมีรายงานไม่มากเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฮีสตามีนได้เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสได้ ดังนั้นหากควบคุมให้ในผลิตภัณฑ์มีปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ก็จะสามารถควบคุมให้ปริมาณฮีสตามีนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้การควบคุมอุณหภูมิของปลาให้ต่ำกว่า 13.2 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง ก่อนการให้ความร้อนสามารถป้องกันการเกิดฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ได้เช่นกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาหาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในรูปของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช และเพื่อคัดแยก halotolerent histamine-forming bacteria จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก ตลอดจนเพื่อศึกษาความสามารถในการลดการผลิต Histamine ของ halotolerant histamine-forming bacteria ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถสรุปผลการวิจัย ได้ดังนี้

1. จากการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักระหว่างช่วงเดือน เมษายน – มิถุนายน 2557 อำเภอละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง พบว่า 60% ของตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นผลิตภัณฑ์ไตปลาหมัก 20% เป็นผลิตภัณฑ์กะปิ 10% เป็นผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม 7% เป็นผลิตภัณฑ์หอยดอง และ 3% เป็นผลิตภัณฑ์กุ้งส้ม

2. จากการวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณเกลือ total volatile basic nitrogen (TVB-N) และ Trimethylamine (TMA) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าค่า pH ของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 4-7 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.67±0.63 โดยผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักทั้งหมดที่นำมาทำการทดสอบในครั้งนี้ค่า pH ส่วนใหญ่อยู่ในระดับที่เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนดไว้ ในขณะที่ปริมาณเกลือของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 5-30% โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 19.56±5.62 % อย่างไรก็ตามในผลิตภัณฑ์กะปิส่วนใหญ่ปริมาณเปอร์เซ็นต์เกลือในผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนที่กำหนด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความต้องการของผู้บริโภคที่นิยม

ผลิตภัณฑ์กะปิที่มีความเค็มไม่มาก ส่งผลให้ผู้ผลิตปรับลดปริมาณเกลือในกระบวนการผลิต สำหรับในผลิตภัณฑ์ประเภทอื่นๆ ปริมาณเกลืออยู่ในระดับที่เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนดไว้

3. การวิเคราะห์ปริมาณ TVB-N ถูกนำมาทดสอบเพื่อให้ทราบถึงปริมาณไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณ TVB-N จะสัมพันธ์กับปริมาณฮีสตามีนที่พบในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ TVB-N ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 200-1,300 mgN/100g ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 697.53±26.05 mgN/100g ตัวอย่าง สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณ TMA ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลทั้ง 30 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ TMA ในตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 14-150 mgN/100g ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 64.02±5.72 mgN/100g ตัวอย่าง โดยพบปริมาณ TMA สูงที่สุดในผลิตภัณฑ์รหัส A2 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์กะปิ

4. สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก พบว่าตัวอย่างรหัส A3 A4 A5 B3 B4 B5 C4 D2 D5 E1 F2 และ F5 มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0 – 25 ppm ตัวอย่างรหัส A1 A2 B2 C1 C2 C3 C5 D1 D3 D4 E2 E5 F1 และ F3 มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 25 – 50 ppm ตัวอย่างรหัส E4 และ F4 มีปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 50 – 75 ppm และในตัวอย่างรหัส B1 และ E3 มีปริมาณฮีสตามีนสูงสุดอยู่ในช่วง 75 – 100 ppm โดยรหัสตัวอย่าง B1 เป็นผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม และตัวอย่างรหัส E3 เป็นผลิตภัณฑ์ไตปลา ทั้งนี้ปริมาณฮีสตามีนที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ยังคงอยู่ในระดับต่ำ

5. จากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก พบว่าตัวอย่าง B3 (ผลิตภัณฑ์ปลาเค็ม) มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงที่สุดอยู่ที่ 8.8×10^6 CFU/g รองลงมาคือตัวอย่าง D1 และ C2 (ผลิตภัณฑ์ไตปลา) ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 5.8×10^5 และ 5.7×10^5 CFU/g

ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ Total coliform และ *E. coli* พบว่าผลิตภัณฑ์ F5 (ผลิตภัณฑ์กะปิ) มีปริมาณ Total coliform สูงที่สุด และพบเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ A2, A4, B3 และ F5

6. จากการคัดแยกเชื้อ histamine forming bacteria จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 27 isolates โดยพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีรูปร่างเป็นทั้งแบบ cocci diplococci rod และ short rod โดยมีแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก (positive) ทั้งสิ้น 5 isolates (A14 A16 A47 A51 และ B25) และติดสีแกรมลบ (negative) ทั้งสิ้น 22 isolates (A11 A12 A13 A15 A17 A18 A110 A41 A42 A43 A44 A45 A46 A48 A49 A4110 A412 A52 B21 B22 B23 และ B24) ทั้งนี้พบว่า isolates A18 A412 และ A51 สามารถสร้างฮีสตามีนในสูงสุด อยู่ที่ระดับ 41.26±0.02 – 41.29±0.02 ppm ตามลำดับ

7. จากการนำเชื้อ isolates A18 A412 และ A51 มาทำการศึกษาผลของปริมาณ Sodium chloride (NaCl) ต่อการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ พบว่าทุก isolates สามารถเจริญได้ดีที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 5% ที่ 12 ชั่วโมง และค่อยๆ ลดการเจริญลงจนถึง 72 ชั่วโมงของการทดลอง ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป ทุก isolates สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง และค่อยๆ ลดการเจริญลงจนถึง 72 ชั่วโมงของการทดลอง ทั้งนี้ปริมาณ NaCl ตั้งแต่ 5 – 20% ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างฮีสตามีน โดย isolate A18 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุดเท่ากับ 411.27±0.09 ppm isolate A412 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุดเท่ากับ 411.62±0.11 ppm และ isolate A51 สามารถสร้างฮีสตามีนสูงสุดเท่ากับ 410.03±0.18 ppm ที่ 36 ชั่วโมงในทุก isolates

บรรณานุกรม

เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม. (ม.ป.ป.). *ยาแก้แพ้ Antihistamine*. วันที่ค้นข้อมูล 25 กันยายน 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.thailabonline.com/respirat-antihis.htm

วงศ์ทิพา โรจนประภพ. (2551). ฮีสตามีนสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้เมื่อรับประทานอาหารทะเล. บทความกระจายเสียงรายการวันนี้กับวิทยาศาสตร์ ครั้งที่ 3, วันที่ค้นข้อมูล 25 กันยายน 2555, เข้าถึงได้จาก http:// siweb.dss.go.th/dss_doc/fulltext/radio/R3.pdf

วรวุฒิ เจริญศิริ. (ม.ป.ป.). ฮีสตามีน. วันที่ค้นข้อมูล 24 กันยายน 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.bangkokhealth.com/index.php/2009-01-19-03-15-03/1841-2009-01-23-03-35-14

วีรชัย สิงห์ทอง. (2556). การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย, วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ

ศิริรัตน์ ตันไสว. (2547). การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกทนร้อนที่ผลิตสารไบโอเจนิกเอมีนจากอาหารหมักไทย. วิทยานิพนธ์มหาบัญฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). จุลชีววิทยาทางอาหาร. นนทบุรี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์. (2557). การลดปริมาณฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์ปลาโดยจุลินทรีย์. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 9 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2556 - พฤษภาคม 2557.

Al-Busaidi Moza Abdallah, Poulose Yesudhason, Khamis Saif Al-Falahi, Adel Khalifa Al-Nakhaili, Nashwa Ali Al-Mazrooei and Saoud Hamood Al-Habsi. (2011). Changes in scomberotoxin (histamine) and volatile amine (TVB-N) formation in Longtail Tuna (*Thunnus tonggol*) stored at different temperatures. *Agricultural and Marine Sciences*, 16:13-22.

Chena, H.C., Kung, H.F., Chenc, W.C., Lind, W.F., Hwang, D.F., Lee, Y.C. and Tsai, Y.H. (2008). Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry*. 106: 612-618.

Cueva, C., García-Ruiz, A., González- Rompinelli, E., Bartolome, B., Martín- Álvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F. and Moreno-Arribas, M.V. (2012). Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology*. 112(4): 672-82.

Enes Dapkevivius, M.L.N., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H. and Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 57(1-2): 107- 114.

Etkind, P., Wilson, M.E., Gallagher, K. and Cournoyer, J. (1987). Bluefish-associated scombroid poisoning. *The Journal of the American Medical Association*. 258 (23): 3409-3410.

European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on biological hazards. *European Food Safety Authority Journal*. 9(10): 2393-2487.

Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization. (2012). The meeting report.

Food and Drug Administration. (2011). Fish and fishery products hazards and controls Guidance (4th ed.). Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Washington, DC.

Gardini, F.M., Martuscelli, M.C., Cruso, F., Galgano, M.A., Crudele, F., Favati, M.E., Gyerzoni and Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol*. 64, 105-117.

Kim, J.H., Ahn, H.J., Jo, C., Park, H.J., Chung, Y.J. and Byun, M.W. (2004). Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control*. 15(5): 405–408.

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

Lee, J.M., Lee, D.C., and Kim, S.M. (2013). The effects of koji and histidine on the formation of histamine in anchovy sauce and the growth inhibition of histamine degrading bacteria with preservatives. *Columbia International Publishing American Journal of Advanced Food Science and Technology*. 1: 25-36.

Lin, C.S., Liu, F.L., Lee, Y.C., Hwang, C.C., and Tsai, Y.H. (2012). Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine-forming bacteria. *Food Chemistry*, 131, 574-579.

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

Rossano, R., Mastrangelo, L., Ungaro, N., and Riccio, P. (2006). Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy Engraulis encrasicholus (L., 1758): a study by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 830: 161–164.

Sekiguchi, Y., Makita, H., Yamamura, A. and Matsumoto, K. (2004). A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97(2): 104– 10.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29(7): 675– 690.

Tapingkaea, W., Tanasupawatb, S., Parkinc, K.L., Benjakula, S. and Visessanguand, W. (2010). Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 92–99.

Taylor, S.L. and Speckhard, M.W. (1983). Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review*. 45: 35–39.

Tsai, Y. H., Lin, C. Y., Chang, S. C., Chen, H. C., Kung, H. F., and Wei, C. I. (2005). Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiology*, 22, 461-467.

Tsai, Y. H., Lin, C. Y., Chien, L. T., Lee, T. M., Wei, C. I., and Hwang, D. F. (2006). Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. *Food Chemistry*, 98, 64-70.

University of Bristol. (2008). Histamine in the body. *Retrieved September 25, 2012*, from www.chm.bris.ac.uk/motm/histamine/jm/body.htm

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S. and Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *Journal of Food Science*. 72(9): M382–90.

Zaman, M.Z., Bakar, E.A., Selamat, J. and Bakar, J. (2010). Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Sciences*. 28(5): 440-449.

Zdzislaw E. Sikorski. (1990). Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation เข้าถึงได้จาก https://books.google.co.th/books?isbn=0849359856

Zhai, H., Yang, X., Li, L. Xia, G., Cen, J., Huang, H., and Hao, H. (2012). Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in Southern China. *Food Chemistry*, 25, 303-308.