รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาศักยภาพพืชสมุนไพรไทยเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสู่มาตรฐานสากล

Development of Thai medicinal plants for improvement of dried seafood products into international standard

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
อรสา สุริยาพันธ์
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802280
สัญญาเลขที่ 65/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาศักยภาพพืชสมุนไพรไทยเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสู่มาตรฐานสากล

Development of Thai medicinal plants for improvement of dried seafood products into international standard

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
อรสา สุริยาพันธ์[2]
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 65/2558

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 65/2558)

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาศักยภาพพืชสมุนไพรไทยเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสู่มาตรฐานสากลในปีที่ 3 ได้ทำการศึกษา 3 ขั้นตอน ได้ทำการศึกษาถึงขั้นตอนที่ 1 คือ การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรผสมในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เติมในหมึกแปรรูปสามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดให้คงที่ตลอดการศึกษา และมีฤทธิ์ฆ่า MRSA T18 และ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ที่เติมลงในในหมึกแปรรูปได้ ขั้นตอนที่ 2 คือ การประเมินเบื้องต้นถึงความเหมาะสมของการเติมสารสกัดสมุนไพรผสมที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูป จากการศึกษาพบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในทุกขั้นตอนของการผลิตหมึกแปรรูป แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การตากแดดครั้งสุดท้ายสามารถกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นกระบวนการที่เหมาะสมในการเติมสารสกัดผสมสมุนไพรจึงควรทำภายหลังจากที่มีการตากแดดครั้งสุดท้ายก่อนการจัดส่งจำหน่าย และขั้นตอนสุดท้ายในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงผลของการเติมสารสกัดผสมในขั้นตอนภายหลังจากที่มีการตากแดดครั้งสุดท้ายในกระบวนการผลิตหมึกแปรรูปก่อนจะนำไปจำหน่ายต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเป็นระยะเวลา 28 วัน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดผสม 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูปได้ดีที่สุดตลอดระยะเวลาการศึกษา 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ 3 ชุดการศึกษา ส่วนในวันที่ 28 ของการศึกษาพบการปนเปื้อนด้วยเชื้อราในทุกชุดการทดลอง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหมึกแปรรูปภายใน 21 วันของการจำลองการจำหน่ายหมึกแปรรูปโดยการเปิดปากถุงตลอด 21 วัน และควรเติมหลังจากขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป

คำสำคัญ: สมุนไพร อาหารทะเลแห้ง สารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้

ABSTRACT

The research project entitled "Development of Thai medicinal plants for improvement of dried seafood products into international standard" in the third year was investigated and divided into 3 processes. In the first step, the appropriate concentrations of mixed medicinal extracts for controlling pathogenic bacteria was determined. Results showed that the mixture of cayenne pepper (*Capsicum annuum* L.) and lemon grass (*Cymbopogon citrates*) at a concentration of 160 mg/ml supplemented in processes squid was able to constantly control the number of total heterotrophic bacteria throughout the experiment and eliminated MRSA T18 and *E. tarda* biogroup 1 DS002 applied in processes squid. The second step related with evaluation of the appropriate step for application of mixed medicinal extracts in dried seafood products processes. Results demonstrated that there was a contamination of total heterotrophic bacteria in every steps of dried seafood products processing. However, sun drying in the last step of dried seafood products processing was able to effectively remove contaminated bacteria. Therefore, the best step for applying the mixture of medicinal herbs on the processing of dried seafood products should be performed at the last sun drying step prior to distribution of the products. The last step of the study was to assay the effect of application of mixed medicinal herbs after sun drying of the products on the numbers and types of total heterotrophic bacteria for 28 days of the experiment prior to distribution of the product for sale. Results showed that the mixed extracts at 160 mg/ml was effectively capable for controlling total heterotrophic bacteria in the processes squid compared to the other three treatments during 21 days of the experiment. However, there was a fungi contamination in all treatments during the study. The obtained results concluded that the mixture extracts of cayenne pepper and lemon grass at 160 mg/ml showed the best combination for controlling the contaminated bacteria in processes squid drying a 21-day of simulation of selling the product by opening the plastic bag and this should be applied in the last step before the sale.

Keywords: Herb, Dried seafood product, Mixture of cayenne pepper and lemon grass extract

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		III
Abstract		IV
สารบัญ		V
สารบัญตาราง		VI
สารบัญภาพ		VII
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	16
4	ผลการทดลอง	24
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	45
เอกสารอ้างอิง		52
ผลผลิต (Output)		63
รายงานสรุปการเงิน		64
ประวัติคณะผู้วิจัย		65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา	24
2	ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป (CFU/g)	26
3	ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย MRSA T18 ในหมึกแปรรูป (CFU/g)	28
4	ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *P. aeruginosa* DS001 ในหมึกแปรรูป (CFU/g)	30
5	ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในหมึกแปรรูป (CFU/g)	32
6	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป (CFU/g)	35
7	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในแต่ละกระบวนผลิตหมึกแปรรูป (48 ชั่วโมง)	36
8	ชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนการผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป	38
9	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในหมึกแปรรูปหน่วย CFU/g	41
10	ชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในระหว่างการจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	*Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Egg Yolk Tellurite Agar	14
2	*Pseudomonas aeruginosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Isolation Agar	15
3	หมึกแปรรูปขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2x2 เซนติเมตร	19
4	(a) หมึกที่ล้างทำความสะอาดแล้ว	21
	(b) เครื่องปรุงรสสำหรับแช่หมึก	21
	(c) หมึกหลังแช่เครื่องปรุงรส	21
	(d) หมึกหลังตากแห้ง	21
	(e) หมึกแปรรูปหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ	21
5	หมึกแปรรูปหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ	22
6	ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ และเติมแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18	27
7	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในหมึกแปรรูปหน่วย CFU/g	42

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ถือว่าเป็นแหล่งทรัพยากรทางด้านสมุนไพรที่มีความหลากหลาย และเป็นประเทศที่มีความก้าวหน้าทางด้านเกษตรกรรมโดยเฉพาะพืชอาหาร ทำให้มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นศูนย์กลางการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพได้ ยิ่งไปกว่านั้นประเทศไทยยังได้เปรียบประเทศอื่นในด้านที่มีทรัพยากรสมุนไพรและภูมิปัญญาดั้งเดิมที่เป็นรากฐานสำคัญ ซึ่งสมุนไพรไทยเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่ายิ่งอย่างหนึ่งของประเทศ การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคและส่วนประกอบของอาหารของบรรพบุรุษไทยนั้นถือได้ว่าเป็นศาสตร์ที่ล้ำลึกและเป็นมรดกทางวัฒนธรรมที่ทรงคุณค่า (รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคณะ, 2542) ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยและต้องการอาหารที่ไม่เจือปนสารเคมีจึงส่งผลให้ผู้ประกอบการและบริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ หันมาสนใจเทคนิคที่ใช้สารที่ได้จากธรรมชาติหรือสารที่ไม่มีความเป็นพิษในการใช้เป็นส่วนผสมหรือใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นทางเลือกจากธรรมชาติที่เป็นวิธีหนึ่งที่มีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพร จากรายงานการศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย พบว่าสารจากธรรมชาติ เช่น พืชพื้นเมืองหรือสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของอาหารได้ (Sofowora, 1982; Brul and Coote, 1999) ซึ่งปัจจุบันมีการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคโดยการใช้สารประกอบที่ค้นพบในธรรมชาติจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหารได้ (Lin et al., 2005) ยกตัวอย่างเช่น การใช้สารสกัดจากเครื่องเทศ ได้แก่ กานพลู โรสแมรี่ ขี้เหล็ก และชะเอม ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในเนื้อหมูสดและแฮมที่เก็บรักษาแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิแช่เย็น โดยพบว่าสารสกัดของพืชสมุนไพรเหล่านี้สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Lactobacillus sake* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhang et al., 2009)

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีความได้เปรียบจากความหลากหลายทางชีวภาพและมรดกทางภูมิปัญญาดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ปัญหาหลักของประเทศไทยด้านการพัฒนาสมุนไพรที่สำคัญคือ ขาดการประยุกต์นำความรู้ด้านภูมิปัญญาสมุนไพรและยังมีข้อจำกัดในการใช้เทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาอย่างเหมาะสม ส่งผลให้องค์ความรู้ในการวิจัยด้านพืชสมุนไพรไทยในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารของประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ประกอบกับเพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อเข้าสู่การเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียนในปี พ.ศ. 2558 จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาและเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยและยกระดับมาตรฐานของผลิตภัณฑ์อาหารของประเทศไทย เพื่อให้สามารถส่งออกไปจำหน่ายในตลาดประชาคมอาเซียนและระดับนานาชาติ คณะผู้วิจัยจึงมุ่งมั่นในการพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศไทยเพื่อยกระดับของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของจังหวัดชลบุรีสู่มาตรฐานสากล ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์และมีราคาที่ถูกเพื่อ

ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ชนิดอื่นที่ใช้ในปัจจุบัน โดยได้เริ่มการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลงสีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 และได้ค้นพบองค์ความรู้ในการประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทางอาหารมากที่สุดชนิดหนึ่งของประเทศไทย รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลากชนิดในอาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* มากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลบางชนิด (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ก, 2553ข; 2553ค; Chotmongcol et al. 2010; Samutsan et al., 2010)

โครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงการพัฒนาการใช้พืชสมุนไพรท้องถิ่นในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ รวมทั้งเมื่อพัฒนาได้แล้วจะทำการศึกษาเปรียบเทียบกับมาตรฐานในระดับประเทศและระดับนานาชาติเพื่อเป็นการมุ่งยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารแห้งที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีสู่มาตรฐานสากลด้วยพืชสมุนไพรของไทย และเพื่อให้มหาวิทยาลัยบูรพาซึ่งเป็นมหาวิทยาลัยในภาคตะวันออกสามารถช่วยเหลือทางด้านวิชาการให้แก่ชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเพื่อทำให้การศึกษาในเรื่องดังกล่าวได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องและสามารถนำไปใช้ได้จริงในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

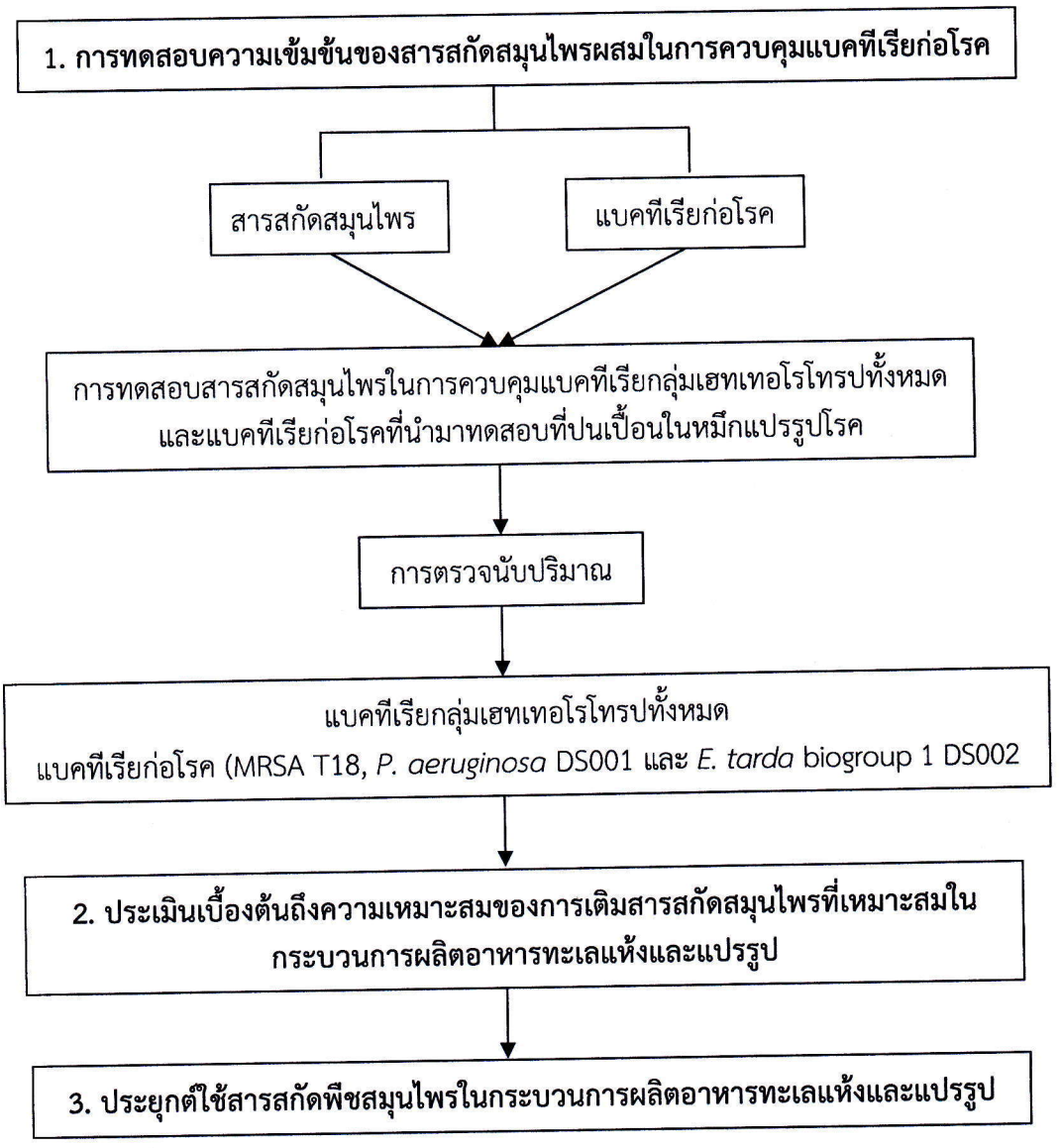
1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้ง
2. เพื่อศึกษาถึงปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งที่ทนต่อฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรแต่ละชนิด
3. เพื่อศึกษาหาระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหารทะเลแห้งที่เติมสารสกัดพืชสมุนไพรแต่ละชนิดที่นานที่สุดและยังคงรักษาระดับมาตรฐานของอาหารทะแลแห้ง

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการประยุกต์ใช้สารสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและเป็นสารสกัดที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการเตรียมหมึกสำหรับการแปรรูป การผสมในเครื่องปรุงที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความ

เหมาะสมในการประยุกต์ใช้สารสกัดพืชสมุนไพรในกระบวนการผลิตว่าขั้นตอนใดมีความเหมาะสมและก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด ตลอดระยะเวลาการทดลองจะทำการประเมินถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้ง

2. ทราบถึงระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมของการใช้สารสกัดพืชสมุนไพรในการควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทะเลแห้ง เพื่อยังคงรักษาระดับมาตรฐานทั้งในระดับประเทศและระดับนานาชาติ

3. สามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากพืชสมุนไพรทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์เพื่อควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรีย ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่างๆ ที่เกิดจากสารเคมีสังเคราะห์ รวมทั้งการใช้พืชสมุนไพรยังเป็นสารเสริมสุขภาพส่งผลให้คุณภาพชีวิตของประชากรไทยในท้องถิ่นและประเทศชาติดีขึ้นเทียบกับมาตรฐานโลก และทำให้ผู้ส่งออกต่างประเทศมีความมั่นใจและยอมรับในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปซึ่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

1. พืชสมุนไพร
2. อาหารทะเลแปรรูป
3. แบคทีเรียก่อโรค

1. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา ส่วนยาสมุนไพร หมายถึง ยาที่ได้จากส่วนของพืช สัตว์และแร่ ซึ่งยังมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ ส่วนการนำมาใช้อาจดัดแปลงรูปลักษณะของสมุนไพรให้ใช้ได้สะดวกขึ้น เช่น นำมาหั่นให้มีขนาดเล็กลง หรือ นำมาบดเป็นผง เป็นต้น (สมภพ ประธานธุรารักษ์ และพร้อมจิต ศรลัมพ์, 2552)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่บริเวณเขตร้อนชื้น ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสูง ส่งผลให้ประเทศไทยถือว่าเป็นแหล่งทรัพยากรทางด้านชีวภาพที่มีความหลากหลาย ยิ่งไปกว่านั้นประเทศไทยยังมีมรดกทางวัฒนธรรมที่เป็นศาสตร์ที่ล้ำลึกและทรงคุณค่า นั่นคือศาสตร์แห่งการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคซึ่งถูกถ่ายทอดมารุ่นแล้วรุ่นเล่า (รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคณะ, 2542) ประกอบกับในปัจจุบันการใช้สมุนไพรได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการวิจัยเพื่อมุ่งพัฒนาศักยภาพการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ประเทศไทยสามารถพึ่งพาตนเองได้ในระยะยาว และสามารถผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อส่งออกจำหน่ายต่างประเทศได้อีกด้วย (นิจศิริ รังษีเรือง และธวัชชัย มังคละคุปต์, 2547)

1) สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร จำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1.1) สารปฐมภูมิ สารชนิดนี้เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูงทุกชนิด ซึ่งเป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช เช่น คาร์โบไฮเดรท ไขมัน โปรตีน เม็ดสี (Pigment) และเกลืออนินทรีย์ (Inorganic salt) เป็นต้น

1.2) สารทุติยภูมิ เป็นสารที่พบได้แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด รวมทั้งมีคุณลักษณะที่จำเพาะและพิเศษแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสาร ยกตัวอย่างเช่น สารประกอบอัลคาลอย (Alkaloid) แอนทราควิโนน (Anthraquinone) และน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) เป็นต้น (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

2) ข้อดีของการใช้สมุนไพร

2.1) มีความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากสมุนไพรส่วนมากมีฤทธิ์อ่อน ก่อให้เกิดอาการเป็นพิษหรืออาการข้างเคียงได้น้อยกว่าการใช้ยาแผนปัจจุบัน

2.2) ค่าใช้จ่ายน้อย เพราะสมุนไพรเป็นพืชประจำถิ่นที่หาได้ง่ายและสามารถปลูกได้อย่างง่ายดาย ส่งผลให้สมุนไพรมีราคาที่ถูกกว่ายาแผนปัจจุบันเป็นอย่างมาก

2.3) เป็นที่พึ่งของคนในชนบทที่ห่างไกล ตามปกติแล้วประชาชนในพื้นที่ชนบทมักเดินทางมารักษาในโรงพยาบาลหรือสถานบริการทางการแพทย์ได้ไม่สะดวกนัก แต่หากมีการใช้สมุนไพรในท้องถิ่นก็จะสามารถรักษาโรคพื้นฐานได้ เช่น อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องผูกและอุจจาระร่วง เป็นต้น

2.4) เป็นการป้องกันการขาดแคลนยาแผนปัจจุบันในสภาวะคับขัน เนื่องจากยาแผนปัจจุบันมักต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ส่งผลให้หากเกิดภาวะขาดแคลนหรือสภาวะสงครามย่อมทำให้การขนส่งเป็นไปได้อย่างยากลำบาก (วันดี กฤษณพันธ์, 2551)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพืชสมุนไพรหลายชนิดถูกนำมาใช้ในเป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติของอาหาร รวมทั้งยังนิยมนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและเป็นสารกันเสียในอาหารอีกด้วย (Shan et al., 2007) โดยสารที่เป็นองค์ประกอบของพืชสมุนไพรที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก คือ สารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย โดยสารกลุ่มโพลีฟีนอลถูกศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติด้านต่าง ๆ มากที่สุด คือ แทนนินและฟลาโวนอยล์ (Ahmad and Beg, 2001; Machado et al., 2003; Naz et al., 2007; Shan et al., 2007) จากการศึกษาพบว่าการบริโภคเครื่องดื่มที่มีส่วนประกอบของแทนนิน ซึ่งส่วนมากพบในชา สามารถรักษาอาการป่วยได้ (Cowan, 1999) โดยแทนนินเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Machado et al., 2003; Voravuthikunchai et al., 2004) พืชสมุนไพรที่พบสารประกอบชนิดนี้ เช่น ผล เปลือก และรากของทับทิม ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาแผนโบราณสำหรับรักษาโรคบิดและโรคอุจจาระร่วง (Ahmad and Beg, 2001; Braga et al., 2005; Voravuthikunchai et al., 2005; Reddy et al., 2007) ในประเทศเยเมนและประเทศต่าง ๆ บนคาบสมุทรอาหรับ นำเปลือกทับทิมที่แห้งมาใช้ในการรักษาอาการอุจจาระร่วง อาการปวดท้องและใช้เป็นยาสมานแผลได้ (Voravuthikunchai et al., 2005)

จากงานวิจัยหลายฉบับได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ดังนี้

พนมพร ภาณุทัต และสาวิตรี วทัญญูไพศาล (2543) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของเครื่องเทศและสมุนไพรไทยจำนวน 19 ชนิด โดยเทคนิค Agar diffusion method พบว่ามีเพียงหัวหอม (*Allium cepa* Linn.) กระเทียม (*Allium sativum* Linn.) พริก (*Capsicum* sp.) หมาก (*Areca catechu*) และใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) มีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เมื่อนำพืชเครื่องเทศและสมุนไพรดังกล่าวทั้งในรูปสารสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์มาศึกษาเพิ่มเติมกับเชื้อแบคทีเรียอีก 5 ชนิด พร้อมทั้งหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) พบว่าสารสกัดจากหมากและใบฝรั่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดที่แตกต่างจากสารสกัดกระเทียม ค่า MIC ของสารสกัดจากหมากและใบฝรั่งอยู่ระหว่าง 62.5-500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาจึงได้ทดสอบการผสมสารสกัดระหว่างกระเทียมกับหมาก และกระเทียมกับใบฝรั่งเพื่อศึกษาขีดความสามารถในการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีผลยับยั้ง พบว่าสารสกัดผสมมี

ศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ขึ้นและไม่มีผลขัดขวางประสิทธิภาพซึ่งกันและกัน นอกจากนั้นสารสกัดใบฝรั่งที่ผ่านความร้อนแล้วยังคงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

สุชาดา ไชยสวัสดิ์ และสุรชัย แก้วบุญเรือง (2551) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในสมุนไพรไทย 5 ชนิด ประกอบด้วย พริก (*Capsicum frutescens* Linn.) ใบมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) หอมแดง (*Allium cepa* Linn.) ขิง (*Zingiber officnale* Rose) และขมิ้นขาว (*Curcuma mangga* Valeton & Zijp) ในรูปน้ำคั้นสด (สารสกัดสด) และสารสกัดน้ำมันโดยใช้แอลกอฮอล์สกัด เพื่อนำมาทดสอบเบื้องต้นในการหาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *Salmonella typhi* ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีศักยภาพสูงในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาศึกษา จึงทำการศึกษาต่อโดยนำสารสกัดสดและสารสกัดน้ำมันของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มาศึกษาในฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อ *S. aureus* และ *S. typhi* โดยวิธี Agar disc diffusion ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า สมุนไพรไทยที่นำมาศึกษาทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแตกต่างกันโดยสารสกัดสดจากขมิ้นขาวแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. typhi* และสารสกัดสดของพริก ใบมะกรูด ขิงและหอมแดง ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่สารสกัดน้ำมันของสมุนไพรทุกชนิดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* โดยใบมะกรูดและขมิ้นขาวแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อในระดับสูง ในขณะที่สมุนไพรอีก 3 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อในระดับปานกลาง และสารสกัดน้ำมันของสมุนไพรทุกชนิดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. typhi* ในระดับปานกลาง ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดน้ำมันของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีศักยภาพสูงในการต้านเชื้อก่อโรค 2 ชนิดที่นำมาศึกษา โดยใบมะกรูดและขมิ้นขาวมีศักยภาพสูงในการต้านเชื้อ *S. aureus* ในขณะที่สารสกัดสดของขมิ้นขาวเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ในขณะที่สมุนไพรชนิดอื่นไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ โดยพบว่าสารสกัดน้ำมันมีศักยภาพสูงกว่าสารสกัดสด ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ของสมุนไพรเหล่านี้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไปในอนาคต

สุชาดา ไชยสวัสดิ์ และคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาสมุนไพรที่ใช้ในครัวไทย 15 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย ผักชี (*Coriandrum sativa* Linn.) หอมแดง (*Allium cepa* Linn.) ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Staph) ใบมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ผิวมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) พริกขี้หนู (*Capsicum frutescens* Linn.) ขมิ้น (*Curcuma longa* Linn.) โหระพา (*Ocimum basilicum* var. *thyrsiflora*) กะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) มะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) ผิวมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) มะเขือพวง (*Solanum torvum* Sw.) และลูกยอ (*Morinda citrifolia*) มาคั้นน้ำสดและสกัดน้ำมัน เพื่อทดลองและศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ขั้นต้น พบว่าสมุนไพรในครัวไทยที่นำมาศึกษา 6 ชนิดคือ ขิง หอมแดง ข่า ใบมะกรูด ผิวมะนาว และผิวมะกรูด มีศักยภาพสูงในการต้านจุลินทรีย์ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค จึงนำสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด มาทำการศึกษาต่อโดยการนำน้ำคั้นสดและน้ำมันสกัดมาศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี Agar diffusion ในเชื้อก่อโรค 3 ชนิดคือ *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* และ *S. aureus* ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพรเกือบทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* และมีเฉพาะสารสกัดขิงเท่านั้นที่ไม่แสดงฤทธิ์ต้าน *S. typhi* โดยน้ำมันสกัดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีกว่าน้ำคั้นสด จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า

ผิวมะกรูด หอมแดงและผิวมะนาวเป็นสมุนไพรในครัวไทยที่ใช้ประกอบอาหารมีศักยภาพสูงในการต้านเชื้อก่อโรค 3 ชนิดที่นำมาศึกษา ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ศึกษาถึงองค์ประกอบหลักและสารสกัดที่เหมาะสมเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และคณะ (2553) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าจำนวน 2 ชนิด คือ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) และกระเทียม (*Allium sativum* Linn.) เปรียบเทียบกับสารสมุนไพรสกัดสดจำนวน 6 ชนิด (ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) กระเทียม (*Allium sativum* Linn.) ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.)ข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) พริก (*Capsicum frutescens* Linn.) และใบมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.)) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 99.8% ในอัตราส่วนสมุนไพร 1 มิลลิกรัมต่อเมทานอล 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางเป็น 3 ระดับความเข้มข้น (20, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทธิซิลิน (Methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus; MRSA) และ *S. aureus* ที่ไวต่อยาเมทธิซิลิน (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; MSSA) กลุ่มละ 20 ไอโซเลท ด้วยวิธี Disk diffusion ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ MSSA เท่ากับ 10% และ 5% ตามลำดับ จากจำนวน MRSA 20 ไอโซเลทและ MSSA กลุ่มละ 20 ไอโซเลท และสารสกัดพืชสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าจากกระเทียมและสารสมุนไพรสกัดสดจากขมิ้นชัน กระเทียม ขิง ข่า พริก และใบมะกรูด ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ MRSA และ MSSA ดังนั้นจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรสำเร็จรูปจากขมิ้นชันมีความสามารถในการยับยั้ง MRSA และ MSSA ได้บางสายพันธุ์

Lopez et al. (2003) ได้ทำการศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดหยาบของสมุนไพรจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ลูกใต้ใบแห้ง (*Phyllanthus niruri*; DPN) ลูกใต้ใบสด (FPB) และพลูแห้ง (*Piper betle*; DPB) ที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารจำนวน 3 ชนิด คือ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella derby* และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus niger* ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค Disc diffusion assay พบว่าสารสกัดพลูแห้งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทุกชนิด ส่วนสารสกัดลูกใต้ใบสดสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *Lactobacillus* spp. ได้ และ *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่ยับยั้งได้โดยสารสกัดลูกใต้ใบแห้ง ต่อจากนั้นทำการศึกษาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) ของสารสกัดด้วยวิธี Agar dilution พบว่าสารสกัดลูกใต้ใบแห้งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 160-10,240 หนึ่งส่วนในล้านส่วน (ppm) โดยพบว่า *S. cerevisiae* มีความไวมากที่สุดและ *B. subtilis* มีความไวน้อยที่สุดต่อสารสกัดลูกใต้ใบแห้ง ทั้งสารสกัดลูกใต้ใบแห้งและสดที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 10,240 ppm ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

Dupont et al. (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดพืชสมุนไพรในประเทศออสเตรเลียจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ มะนาวเมอร์เทิล (*Backhousia citriodora*) ยี่หร่า (*Anetholea anisata*) เปลือกมะนาว (*Eucalyptus staigerana*) หมากฝรั่งสตรอเบอร์รี่

(*Eu. olida*) และบุชมินท์ (*Prostanthera incisa*) ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเฮกเซน ต่อแบคทีเรียในอาหารจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิค Microtitre broth microdilution โดยพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรทุกชนิดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งต่ำหรือไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้ ยกเว้น *S. aureus* โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำของสารสกัดพืชสมุนไพรทุกชนิดมีค่าค่อนข้างสูง (15.6-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ยกเว้นสารสกัดจากบุชมินท์ นอกจากนี้สารสกัดของพืชสมุนไพรทุกชนิดที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซนมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่า *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.8-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *E. coli* และ *L. monocytogenes* ให้ผลในทางตรงข้ามกันคือพบว่ามีสารสกัดพืชสมุนไพรเพียง 5 ชนิด จากสารสกัดพืชสมุนไพรทุกชนิดร่วมกันจำนวน 15 สารสกัด ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ สารสกัดจากสมุนไพรพื้นเมืองของออสเตรเลียที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารเพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาหรือส่งเสริมความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Weerakkody et al. (2010) รายงานการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ระหว่างสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพร 4 ชนิดที่ไม่นิยมใช้ ประกอบด้วย โกรากา (*Garcinia quaesita*) ขิง (*Alpinia galanga*) เปลือกมะนาว (*Eucalyptus staigerana*) และพริกไทยภูเขา(*Tasmannia lanceolata*) และเครื่องเทศและสมุนไพรที่นิยมใช้ 3 ชนิดได้แก่ พริกไทย (*Piper nigrum*) โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) และออริกาโน (*Oreganum vulgare*) โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลและเฮกเซน นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์กับแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้เทคนิค Agar disc diffusion และ Broth dilution assays ผลการทดลองพบว่า ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพร ยกเว้นสารสกัดพริกไทย ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งน้อยหรือไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเลย โดยทั่วไปสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพรมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สารสกัดจากสมุนไพรและเครื่องเทศที่ไม่นิยมใช้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอล และสารสกัดเปลือกมะนาวที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ/หรือ *L. monocytogenes* ได้ดี นอกจากนั้นค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) ที่ศึกษาด้วยเทคนิค Broth dilution และค่าบริเวณยับยั้งที่ศึกษาด้วยเทคนิค Disk diffusion ไม่ได้มีความสัมพันธ์กันอย่างมาก (r^2 อยู่ระหว่าง 0.10-0.70) ดังนั้นจึงเป็นการชี้ให้เห็นว่าการเลือกเพียงหนึ่งวิธีสำหรับการทดสอบสารต้านจุลินทรีย์อาจก่อให้เกิดข้อสรุปที่ไม่แน่นอน นอกจากนั้นการศึกษาในครั้งนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพรแต่ละชนิดเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และระดับของสารกลุ่มฟีนอล ซึ่งพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพืชสมุนไพรและเครื่องเทศที่ไม่นิยมใช้มี

ศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร การศึกษานี้ได้บ่งชี้ว่าฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ในสมุนไพรและเครื่องเทศบางชนิดอาจเกิดจากสารอื่นที่ไม่ใช่สารกลุ่มฟีนอล

2. อาหารทะเลแปรรูป

อาหารทะเลแปรรูปมีมากมายหลายชนิด อาทิ ปลา กุ้ง หอย ปู หมึกและสาหร่ายทะเล เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันอาหารทะเลเป็นผลิตภัณฑ์อาหารยอดนิยมทั่วโลกเลยทีเดียว นอกจากจะมีรสชาติอร่อยแล้วยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก ไม่ว่าจะเป็นด้านโปรตีน วิตามิน และเกลือแร่ ธาตุอาหารบางอย่างที่สำคัญและจำเป็นสำหรับมนุษย์หาได้เฉพาะในอาหารทะเลเท่านั้น เช่น ธาตุไอโอดีน เป็นต้น (ศรีสมร คงพันธุ์ และมณี สุวรรณผ่อง, 2533) ซึ่งการแปรรูปอาหารทะเลส่วนใหญ่ของคนไทยมักใช้กระบวนการหมักด้วยเกลือและการตากแห้ง ยกตัวอย่างเช่น เคยหรือกะปิ อันเป็นเครื่องปรุงรสหลักของสังคมไทย รวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารทะเลอื่นที่มีลักษณะเค็มและแห้ง ได้แก่ ปลาเค็ม ปลาแห้ง กุ้งแห้ง หอยแห้งและหมึกแห้ง เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ล้วนเป็นสัญลักษณ์ของแหล่งท่องเที่ยวตามชายทะเลของประเทศไทย เช่น ชลบุรีและระยอง เป็นต้น (ชมพู่ ยิ้มโต, 2550)

แต่อย่างไรก็ตามการบริโภคอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปสามารถก่อให้เกิดโรคได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร ยกตัวอย่างเช่น *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* เป็นต้น โดย *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงจากการบริโภคอาหารทะเลดิบ โดยจะแสดงอาการหลังการบริโภคอาหารประมาณ 15 ชั่วโมง ในประเทศญี่ปุ่นแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษถึงร้อยละ 50-70 (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551; Wittman and Flick, 1995; Munn, 2004) สำหรับ *V. cholerae* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรค ซึ่งทำให้เกิดโรคเฉพาะคนเท่านั้น โดยผู้ป่วยจะแสดงอาการคลื่นไส้อาเจียน ถ่ายเหลวจนถึงอุจจาระร่วง ส่งผลให้ร่างกายเกิดสภาวะขาดน้ำและเกลือแร่ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551; Hosseini et al., 2003) โดยไม่นานมานี้สำนักงานป้องกันควบคุมโรค (2551) ได้ตรวจพบผู้ป่วยที่มีอาการของโรคอหิวาตกโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 และจากข้อมูลของสำนักระบาดวิทยาพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ. 2540-2545 ตามลำดับ (ศรีวรรณา หัทยานานนท์, 2554)

นอกจากนั้นงานวิจัยหลายฉบับได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนี้

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และคณะ (2532) ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีของกุ้งแห้งที่จำหน่ายทั่วไป พบว่ากุ้งแห้งมีจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนค่อนข้างสูง มีกลิ่นแอมโมเนียและมีปริมาณรงควัตถุแอสตาแซนทีนต่ำ กุ้งแห้งส่วนใหญ่มีความชื้นค่อนข้างสูงถึง 30% – 50% มีกลิ่นแอมโมเนีย จึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูง มีค่าประมาณ 8.00 – 8.4 มีค่าปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ในช่วง 0.72 – 0.78 และมีปริมาณเกลือสูงถึง 9% – 13% และจากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *S. aureus* และเชื้อรามีค่าเท่ากับ

5.00×10^{5}, 1.00×10^{2} และ 5.00x10 CFU/g ตามลำดับ แต่ไม่พบ *E. coli และ Salmonella* sp. ในตัวอย่างกุ้งแห้ง

สินหทัย สมบูรณ์ยิ่ง (2545) ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี จำนวน 40 ตัวอย่าง ในเดือนตุลาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2544 โดยเก็บตัวอย่างจาก 4 ร้าน ร้านละ 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนเชื้อรา *E. coli* และแบคทีเรียก่อโรค คือ *S. aureus, Salmonella* sp. และ *Clostridium perfringens* พบว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสไม่ได้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเลขที่ มอก.972-2533 เนื่องจากมีเชื้อราเกินกำหนด และพบ *E. coli* เกินกำหนด 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวในตัวอย่าง

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ก) ศึกษาถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีจำนวน 21 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา (คิดเป็น 100%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มมากที่สุดคือ หมึกกะตอย มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.97\pm0.16\times10^{9}$ CFU/g และพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีจำนวน 3 ตัวอย่าง (คิดเป็น 12.5%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีมากที่สุดคือ หมึกไข่ มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.70\pm0.21\times10^{4}$ CFU/g เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มในผลิตภัณฑ์หมึกแห้ง พบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* มากที่สุด รองลงมาคือ *Micrococcus* และ *Bacillus* ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่จำแนกได้คือ *Proteus, Enterobacter* และ *Klebsiella* ดังนั้นควรมีการติดตามตรวจสอบและตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหารเป็นระยะ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่บริโภคในแต่ละวันและผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออก

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ข) ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในอาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าอาหารทะเลแห้งมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปอยู่ในช่วง $6.00\pm2.00\times10^{2}$ ถึง $4.40\pm1.22\times10^{9}$ CFU/g โดยพบมากที่สุดในตัวอย่างหมึกกะตอยแห้ง และพบน้อยที่สุดในตัวอย่างหนวดหมึกชุบน้ำเชื่อม เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* มากที่สุด รองลงมาคือ *Bacillus* และ *Micrococcus* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Corynebacterium* spp., *Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, K. ozaenae, Listeria* spp. และ *Proteus mirabilis* ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีคุณภาพทางจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น

Ayulo et al. (1994) ทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปลาและความปลอดภัยของอาหารทะเลที่จับได้จากบริเวณชายฝั่งของรัฐซานตา คาทารินาและจำหน่ายในเมืองฟลอเรียโนโปลิส ประเทศบราซิล จากการตรวจคุณภาพปลา Acoupa blanc (*Cynoscion leiarchus*) ทั้งที่อยู่ในรูปของปลาสดและแปรรูป กุ้งขาว (*Peneaus paulensis*) หอย (*Anomalocardia brasiliensis*) หอย Blue mussel (*Mytilus edulis*) และปูม้า (*Callinectes sapidus*) จากตลาดจำนวน 175 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่า ในตัวอย่าง 175 ตัวอย่างตรวจพบ *S. aureus* จำนวน 35 ตัวอย่าง

คิดเป็น 20% และจากตัวอย่างเนื้อหอยคิดเป็น 60% และพบว่า *S. aureus* จำนวน 109 สายพันธุ์ มีจำนวน 9 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ได้แก่ เอนเทอโรทอกซินเอจำนวน 4 สายพันธุ์ เอนเทอโรทอกซินดีจำนวน 1 สายพันธุ์ และเอนเทอโรทอกซินเอบี 4 สายพันธุ์ จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าควรมีการจัดการเอาใจใส่ในระหว่างการจับสัตว์น้ำและหลังการจับสัตว์น้ำที่ได้เพื่อลดการปนเปื้อนแบคทีเรียของปลาและอาหารทะเล

Jeyasekaran et al. (2004) ศึกษาการเก็บรักษาปลาบรีม (*Lethrinus miniatus*) โดยใช้น้ำแข็งแห้ง 20% ร่วมกับน้ำแข็ง 50% พบว่าเป็นสภาวะที่ดีในการเก็บรักษาได้ถึง 24 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติมน้ำแข็งเพิ่ม โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^4-10^7 CFU/g ในขณะที่แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำมีปริมาณ 10^2-10^4 CFU/g ปริมาณแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง 10^1-10^2 CFU/g แบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟล์ตรวจพบที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณ 10^2 CFU/g แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดและแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญและรีดิวซ์ซัลไฟด์ไม่แสดงแนวโน้มที่สอดคล้องกัน

Immanuel et al. (2006) รายงานว่าปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งมังกรที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นในกระบวนการขนส่งมีค่าเท่ากับ 8.12-8.17 Log cfu/ml และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะ 14 ชั่วโมง ของการขนส่ง โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียมีค่าสูงสุด (6.23%) ในชั่วโมงที่ 2 ของการขนส่ง ซึ่งแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งมังกรตลอดระยะเวลาการขนส่ง ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus circulans, Escherichia coli, Photobacterium damselae, Flexibacter columnare, Micrococcus luteus* และ *Enterobacter aerogenes* ยกเว้น *Corynebacterium xerosis* ที่พบ 12 ชั่วโมงแรกของการขนส่งเท่านั้น

Lalitha and Surendran (2006) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและชนิดของแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง และแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำในกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่ากุ้งก้ามกรามมีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวเท่ากับ 4.5-7, 4.3-7.4 และ 3-7.1 Log cfu/g ตามลำดับ โดยแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 26 วัน ซึ่งแบคทีเรียที่ตรวจพบในกุ้งก้ามกราม ได้แก่ *Aeromonas, Shewanella puterfaciens, Moraxella, Pseudomonas, Cytophaga, Enterococcus, Micrococcus, Corynebaterium* และ *Bacillus*

3. แบคทีเรีย

3.1 *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella spp. พบครั้งแรกใน ค.ศ.1965 มีด้วยกัน 3 สายพันธุ์ คือ *E. tarda, E. hoshinae* และ *E. ictaluri* พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดเย็น เช่น ปลา สัตว์เลื้อยคลาน และตามสิ่งแวดล้อม และก่อโรคในปลา (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, 2553) สปีชีส์ที่มีการรายงานการก่อโรคในมนุษย์คือ *E. tarda* แบคทีเรียชนิดนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับ *Escherichai coli* ยกเว้นความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ใน KIA หรือ TSI และไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็คโทส ซึ่งคล้ายกับ *Citrobacter* หรือ *Salmonella* (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2552) ซึ่งพบว่า

E. tarda สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคอุจาระร่วง เป็นต้น (Slaven et al., 2001; Wang et al., 2005) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีความคล้ายคลึงกับ *E. tarda* แต่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอลน้ำตาลซูโคส และน้ำตาลอะราบิโนส จึงให้ชื่อว่า "*E. tarda* biogroup 1" (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2552)

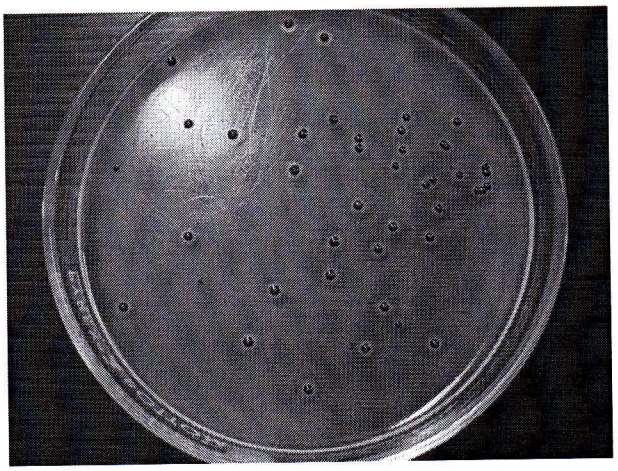
3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Micrococcaceae รูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ ย้อมติดสีแกรมบวก เมื่อแบ่งเซลล์จะเรียงตัวติดกันเป็นรูปคล้ายพวงองุ่น ถ้าเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งเซลล์มีลักษณะเป็นกลุ่ม แต่จากอาหารเหลวอาจเห็นเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะเลี้ยง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโคโลนีส่วนใหญ่ของ *S. aureus* จะมีสีเหลืองทอง สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากรงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์ บางครั้งพบว่าโคโลนีมีสีตั้งแต่สีส้มจัดจนถึงสีเหลืองอ่อน (อัจฉรา เพิ่ม, 2550) *Staphylococcus* เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (Microaerophile; นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *S. aureus* คือ 30-37 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสม คือ 7.0-7.5 แต่เจริญได้ดีที่พีเอช 4.2-9.3 ต้องการปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญ 2 ชนิด คือ Adenine และ Thiamine แต่เมื่อเจริญอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจนจะต้องการ Uracil และ Pyruvate เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น Nutrient agar (อัจฉรา เพิ่ม, 2550) ให้ผลการทดสอบคะตาเลส (Catalase) เป็นบวกและให้ผลบวกกับโคแอกกูเลส (Coagulase positive; นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) *S. aureus* มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในอาหารหลายชนิด โดยเชื้อปนเปื้อนในอาหารเหล่านี้ทางแผล ฝี หนอง ที่ผิวหนังของผู้ปรุงอาหาร เช่น อาหารพวกคัสตาร์ด สลัด เนื้อและผลิตภัณฑ์นม (Dairy product) อาหารที่ปนเปื้อน *S. aureus* จะมีกลิ่นและรสปกติ (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

S. aureus เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฝีหนอง 80% เป็นเชื้อที่สำคัญในโรงพยาบาลและในชุมชน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ผลิตสารพิษ (Enterotoxin) ที่ทนทานต่อความร้อนสูง เป็นเชื้อแบคทีเรียที่กระจายอยู่ทั่วไป พบตามร่างกายของคนเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโพรงจมูก รูหูของคน ผิวหนัง แผลที่นิ้วมือ (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546) บาดแผลที่มีหนอง เต้านมวัวที่อักเสบ แต่ถ้าผิวหนังเกิดบาดแผล ถลอกหรือได้รับการผ่าตัด เชื้อนี้จะบุกรุกเข้าเนื้อเยื่อชั้นในได้ เมื่อเข้ากระแสเลือดจะทำให้เกิดโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบเฉียบพลัน ไม่ทนความร้อน แต่สารพิษที่เชื้อแบคทีเรียนี้สร้างขึ้นสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 100 – 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ทนทานต่อความแห้งแล้ง Enterotoxin (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546) ที่พบส่วนใหญ่ ทำให้เกิดอาการอักเสบของเซลล์บุทางเดินอาหาร และดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้วกลับมาทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง แต่มักไม่มีไข้ (อัจฉรา เพิ่ม, 2550) โดยทั่วไปจะเกิดอาการอาหารเป็นพิษ หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนประมาณ 3 ชั่วโมง (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546) และมักหายเองภายใน 8 ชั่วโมง แต่อาจเกิดอาการรุนแรงได้ในทารก คนชรา หรือผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ บางชนิดสร้างแคปซูลซึ่งเพิ่มความรุนแรงของการทำให้เกิดโรค (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

ในบรรดา Staphylococci ปรากฏว่า *S. aureus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษบ่อยที่สุด ตามปกติคาดว่าจะมีอยู่ในอาหารเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะอาหารที่มีนมและเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ และอาหารที่ผ่านการสัมผัสและเคลื่อนย้ายด้วยมือมนุษย์ รวมทั้งอาหารที่ไม่ได้ทำให้สุกก่อนบริโภค (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

เชื้อ Methicillin – resistant *S. aureus* (MRSA) เป็นเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่ม (Multiple drug resistance) เช่น ยาเพนิซิลลิน (Penicillins) เตตราไซคลิน (Tetracyclines) ซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamides) ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal inhibition concentration, MIC) ต่อยาเมทิซิลลิน (Methicillin) มากกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือมีค่า MIC ต่อยาออกซาซิลลิน (Oxacillin) มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, 2553) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง แสดงดังภาพที่ 1

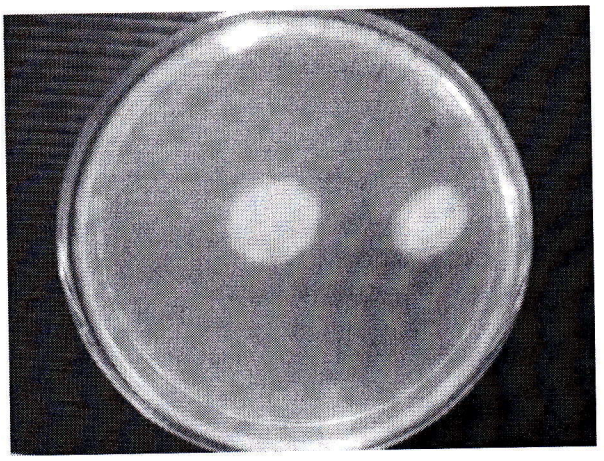


ภาพที่ 1 *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Egg Yolk Tellurite Agar (ภาพโดย พรพิมล สุดแสวง)

3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa จัดอยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มใหญ่ที่สุด มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ผนังเซลล์มีโครงสร้างเหมือน Enterobacteriaceae ซึ่งประกอบด้วยลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ต้องการออกซิเจนในการเจริญแต่ก็เพิ่มจำนวนได้ช้า ๆ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนถ้ามีไนเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างระหว่าง 20-42 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) ชอบเจริญในที่ชื้นและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ รวมทั้งในสภาพที่มีเกลือสูง ๆ สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งสร้างพลังงานได้ง่าย ๆ เช่น แอมโมเนีย (NH_4) เป็นแหล่งให้ไนโตรเจน อาจใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

P. aeruginosa สามารถเจริญได้ในอาหารธรรมดาที่ใช้แยกเชื้อ มักให้รงควัตถุสีเขียว โคโลนีขนาดใหญ่และแพร่กระจาย ดังภาพที่ 2 เมื่อเลี้ยงในอาหารผสมเลือดมักให้ลักษณะโคโลนีเป็นมันเงาคล้ายโลหะ (Metallic sheen) อาจเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะจับกันเป็นแผ่นที่ผิวหน้าอาหาร (Pellicle) ซึ่งแสดงว่าเชื้อชอบออกซิเจน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547)



ภาพที่ 2 *Pseudomonas aeruginosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Isolation Agar (ภาพโดย พรพิมล สุดแสวง)

P. aeruginosa เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน น้ำทิ้ง และของที่เน่าเสีย (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546) ลำคอ อุจจาระของคนธรรมดา ซอกพับแขน ขา นอกจากนี้ยังพบในน้ำยาฆ่าเชื้อ สบู่ เฮกซาคลอโรฟีน ครีม โลชั่น วัสดุอุปกรณ์ข้างเตียงผู้ป่วย และเครื่องมือทางการแพทย์ต่าง ๆ ล้วนแต่เคยตรวจพบมาแล้วทั้งสิ้น การทนต่อสภาพแวดล้อมทั่วไป ทำให้ง่ายที่จะปนเปื้อนกับอุปกรณ์การแพทย์ต่าง ๆ เช่น การแช่เครื่องมือการแพทย์ในน้ำยาฆ่าเชื้อแล้วนำมาใช้ตรวจสอบภายในร่างกายผู้ป่วย เชื้อ *P. aeruginosa* เข้าไปในผู้ป่วยทำให้เกิดอาการติดเชื้อภายในรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต การติดเชื้อ *P. aeruginosa* จะพบในผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลน้อยกว่าปกติ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน แผลไหม้รุนแรง ส่วนใหญ่การติดเชื้อมักเริ่มจากระบบหายใจส่วนล่าง ทางเดินปัสสาวะ ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ๆ โดยเฉพาะการติดเชื้อที่แผลไฟไหม้ และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยใช้เครื่องสวนหลอดปัสสาวะ การเกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบพบในผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ โดยแหล่งของการติดเชื้ออยู่ที่เครื่องมือที่ปนเปื้อน มักทำให้เกิดอาการลิ้นหัวใจอักเสบและเรื้อรัง (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) และผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันมักเกิดการติดเชื้อได้ง่ายทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายและเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและปอดบวมตามมา (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 ขวดรูปชมพู่
1.2 ชุดเครื่องแก้วกลั่นระเหย (Evaporation flask)
1.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
1.4 หัวกรองขนาด 0.20 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Minisart RC 25 ประเทศเยอรมนี
1.5 กระดาษกรอง Whatman filter No.1 ประเทศอังกฤษ
1.6 กระบอกตวง (Cylinder)
1.7 บีกเกอร์ (Beaker)
1.8 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PG 802-S ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
2.2 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Gilson รุ่น N21808C ประเทศฝรั่งเศส
2.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy autoclave รุ่น SS-325 ประเทศญี่ปุ่น
2.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น KG 8540 ประเทศเยอรมนี
2.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE400 ประเทศเยอรมนี
2.6 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30RE200 ประเทศเยอรมนี
2.7 เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump) ยี่ห้อ Thomas รุ่น DOA-V130-BN ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.8 เครื่องปั่น (Blender) ยี่ห้อ Moulinex รุ่น AW9 ประเทศอินโดนีเซีย
2.9 ตู้เย็น ยี่ห้อ Sanden รุ่น Intercool ประเทศไทย
2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 854 Schwabach ประเทศเยอรมนี
2.11 เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-205/V Basic ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
2.12 Laminar flow biological safety cabinet ยี่ห้อ Super Clean รุ่น 150 VC ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.13 เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ PNP Green SSeriker II ประเทศไทย

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 0.1% (w/v) Peptone water ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
3.2 Plate count agar (PCA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 Baird-Parker Egg Yolk Tellurite Agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4 Hektoen Enteric agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5 Pseudomonas Isolation Agar ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย

4. แบคทีเรีย

4.1 *Edwardsiella tarda* biogroup 1 DS002

4.2 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) T18

4.3 *Pseudomonas aeruginosa* DS001

5. สมุนไพร

5.1 พริกชี้ฟ้า

5.2 ตะไคร้

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรผสมในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค

1.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (ดัดแปลงมาจาก Quave et al., 2008)

นำสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ พริกชี้ฟ้าและตะไคร้ มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำสมุนไพรแต่ละชนิดใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ขวดละ 50 กรัม แล้วเติม 95% เอทานอล ในอัตราส่วนสมุนไพรต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 10 จากนั้นนำไปใส่เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบเท่ากับ 100-120 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง กรองสารสกัดสมุนไพรด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump) จากนั้นนำสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ผ่านการกรองแล้ว มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 175 มิลลิบาร์ เพื่อสกัดเอทานอลออกจากสารสกัดสมุนไพร แล้วนำสารสกัดสมุนไพรที่ได้มาหา % yield ตามวิธีการของ AOAC (1990) จากนั้นนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

สูตรการคำนวณหา % yield

$$\text{ปริมาณสารที่สกัดได้ (Extract yield) (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดสมุนไพรหลังจากระเหยตัวทำละลายออก (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของสมุนไพร (กรัม)}}$$

1.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบมี 3 ชนิด คือ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) T18, *Pseudomonas aeruginosa* DS001 และ *Edwardsiella tarda* biogroup 1 DS002 ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้ง จากห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1.3 การทดสอบสารสกัดสมุนไพรในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบที่ปนเปื้อนในหมึกแปรรูป (ดัดแปลงจาก Zhang et al., 2009)

ตัดหมึกแปรรูปให้มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2x2 เซนติเมตร (ภาพที่ 3) จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 9 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่นแทนสารสกัดสมุนไพร และไม่เติมแบคทีเรีย
ชุดที่ 2 เติมเอทานอล 35% แทนสารสกัดสมุนไพร และไม่เติมแบคทีเรีย
ชุดที่ 3 เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และไม่เติมแบคทีเรีย
ชุดที่ 4 ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และเติม MRSA T18
ชุดที่ 5 เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และเติม MRSA T18
ชุดที่ 6 ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และเติม *P. aeruginosa* DS001

ชุดที่ 7 เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และเติม *P. aeruginosa* DS001
ชุดที่ 8 ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และเติม *E. tarda* biogroup 1 DS002
ชุดที่ 9 เติมสารสกัดสมุนไพรผสม และเติม *E. tarda* biogroup 1 DS002

ภาพที่ 3 หมึกแปรรูปขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2x2 เซนติเมตร
(ภาพโดย พรพิมล สุดแสวง)

เติมเชื้อ MRSA T18, *P. aeruginosa* DS001 หรือ *E. tarda* biogroup 1 DS002 โดยปิเปตเชื้อที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.0×10^{4} CFU/mL ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างหมึกแปรรูป จากนั้นเกลี่ยแบคทีเรียทดสอบให้ทั่วผิวหน้าของตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง เติมสารสกัดความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างหมึกแปรรูป นำตัวอย่างหมึกแปรรูปมาผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow biological safety cabinet เป็นเวลา 15 นาที นำหมึกแปรรูปมาเก็บรักษาในถุงพลาสติกโดยแยกใส่ชิ้นละ 1 ถุง แล้วนำมาแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำหมึกแปรรูปมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียในวันที่ 0, 2, 4, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง

1.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria; ดัดแปลงจาก Jeyasekaran et al., 2004)

เติม 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างหมึกแปรรูป 1 ชิ้น จากนั้นนำไปตีผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} แล้วเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-3} ปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และบันทึกผล

1.5 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียก่อโรค (MRSA T18, *P. aeruginosa* DS001 และ *E. tarda* biogroup 1 DS002; ดัดแปลงจาก Keskin and Ekmekci, 2007; Normanno et al., 2005; Wei et al., 2012)

เติม 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างหมึกแปรรูป 1 ชิ้น จากนั้นนำไปตีผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} แล้วเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-3} ปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Egg Yolk Tellurite Agar สำหรับตรวจนับ MRSA อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Isolation Agar สำหรับตรวจนับ *P. aeruginosa* DS001 และอาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen Enteric *agar* สำหรับตรวจนับ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และบันทึกผล

2. การประเมินเบื้องต้นถึงความเหมาะสมของการเติมสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูป

ทำการศึกษาถึงกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูปทุกขั้นตอน โดยใช้อาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่มีแนวโน้มที่จะคุ้มทุนและเหมาะสมต่อการเติมสมุนไพร ในการทดลองครั้งนี้ได้นำหมึกสดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หมึกแห้งปรุงรส โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

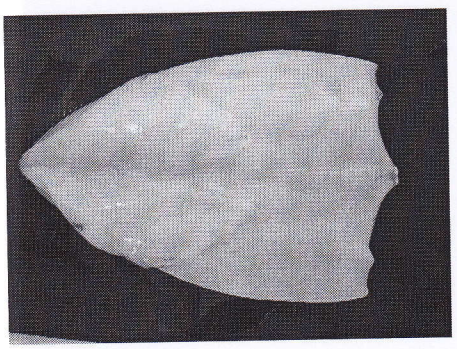
2.1 การผลิตหมึกแปรรูป

นำหมึกสดมาล้างทำความสะอาด โดยการผ่าเอาตาและดีออก ใช้มีดผ่ายาวกลางลำตัวของหมึก แล้วมาผสมกับเครื่องปรุงรส จากนั้นไปแผ่ไว้ในตะแกรง และนำไปตากแดดทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน หรือจนกว่าหมึกจะแห้ง หลังจากนั้นนำหมึกมาย่างและบดเป็นแผ่นบาง ๆ และนำมาตากให้แห้งอีกครั้งประมาณ 1-2 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4

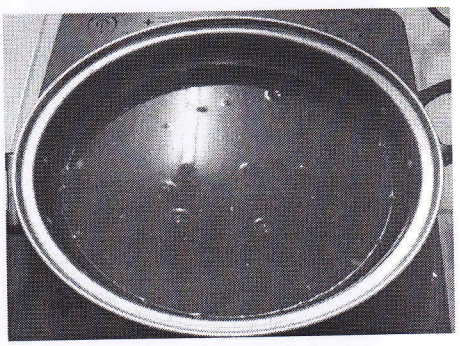
2.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป

ตัดตัวอย่างหมึกแปรรูปในแต่ละขั้นตอน ได้แก่ หลังล้างทำความสะอาด หลังแช่เครื่องปรุงรส หลังตากแดด หลังย่าง หลังบดและหลังตากแดดครั้งที่ 2 ให้มีขนาดกว้าง x ยาว ด้านละ 2 เซนติเมตร จากนั้นเติม 0.1% (w/v) Peptone water ใส่ลงในตัวอย่าง 1 ชิ้น โดยคำนวณปริมาตรตามน้ำหนักของชิ้นหมึกตัวอย่างให้ได้ระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} จากนั้นนำไปตีผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} ทำเช่นนี้ให้ได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-4} จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (3 ซ้ำ) ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อ

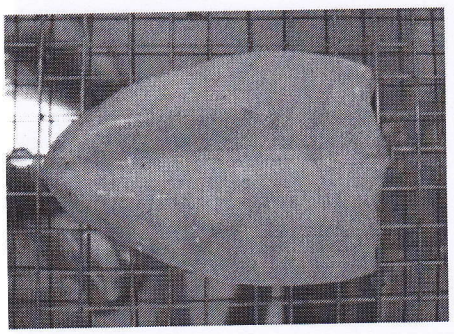
เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และบันทึกผล



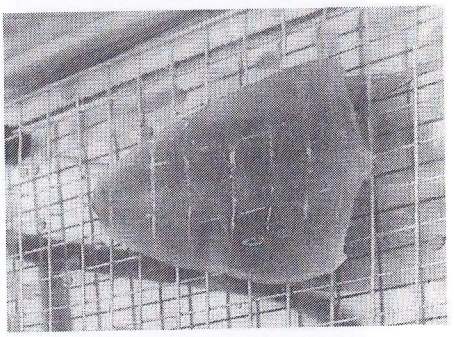
(a)



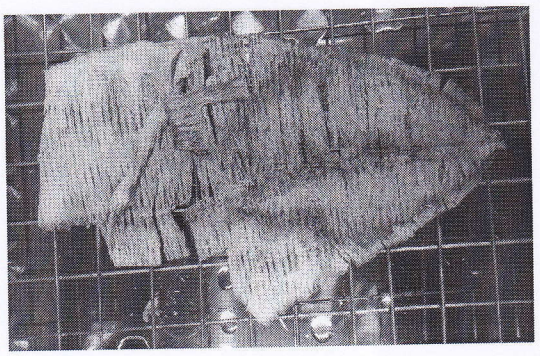
(b)



(c)



(d)



(e)

ภาพที่ 4 (a) หมึกที่ล้างทำความสะอาดแล้ว
(b) เครื่องปรุงรสสำหรับแช่หมึก
(c) หมึกหลังแช่เครื่องปรุงรส
(d) หมึกหลังตากแห้ง
(e) หมึกแปรรูปหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ
(ภาพโดย พรพิมล สุดแสวง)

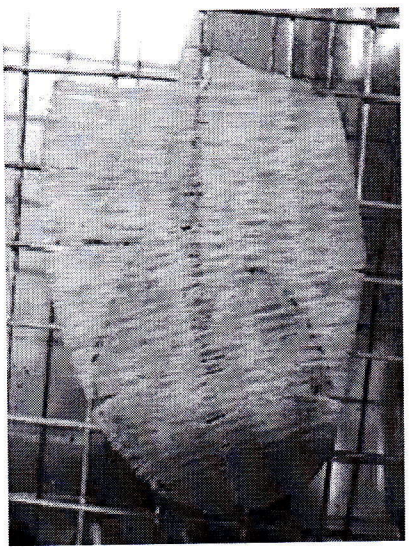
3. การประยุกต์ใช้สารสกัดพืชสมุนไพรในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูป

ทำการประยุกต์ใช้สารสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและเป็นสารสกัดที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการเตรียมหมึกสำหรับการแปรรูป การผสมในเครื่องปรุงที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น ตลอดระยะเวลาการทดลองจะทำการประเมินถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาเพื่อประเมินความเหมาะสมที่ก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในด้านของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป โดยนำมาศึกษาดังนี้

3.1 การศึกษาผลของสารสกัดผสมระหว่างพริกขี้ฟ้ากับตะไคร้ในการควบคุมจุลินทรีย์และแบคทีเรียก่อโรคที่พบในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาหมึกแปรรูป (ดัดแปลงจาก Zhang et al., 2009)

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตหมึกแปรรูปในข้อ 2 ทำให้ทราบว่าการตากแดดในขั้นตอนสุดท้ายก่อนส่งไปจำหน่ายสามารถกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพและต่อมาพบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในปริมาณที่ค่อนข้างสูงในขั้นตอนของการเก็บรักษาหรือช่วงที่วางไว้เพื่อจำหน่าย ดังนั้นในขั้นตอนต่อมาคือจึงทำการทดสอบผลของสารสกัดผสมระหว่างพริกขี้ฟ้ากับตะไคร้ที่ความเข้มข้น 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการควบคุมปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหมึกแปรรูปในขั้นตอนของการเก็บรักษา

3.1.1 ผลิตหมึกแปรรูปตามขั้นตอนในหัวข้อ 2.1 (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 หมึกแปรรูปหลังเสร็จสิ้นกระบวนการ
(ภาพโดย พรพิมล สุดแสวง)

3.1.2. สเปรย์สารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างหมึกแปรรูป โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ดังนี้

ชุดที่ 1 ไม่สเปรย์สารสกัด (ชุดควบคุมที่ 1 สเปรย์น้ำกลั่นแทนสารสกัด)

ชุดที่ 2 ไม่สเปรย์สารสกัด (ชุดควบคุมที่ 2 สเปรย์เอทานอล 35% (v/v) แทนสารสกัด)

ชุดที่ 3 สเปรย์สารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดที่ 4 สเปรย์สารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่ความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.3 นำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow biological safety carbinet เป็นเวลา 15 นาที

3.1.4 นำผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่ได้มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทอเทอโรโทรปทั้งหมดด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหาร Plate Count Agar (PCA)

3.1.5 นำตัวอย่างไปจำลองการขายโดยเปิดถุงแล้วตั้งทิ้งไว้ จากนั้นตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในวันที่ 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28 ของการทดลอง

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± Standard deviation) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการทดลองโดยใช้ One - way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 19 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P<0.05$)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

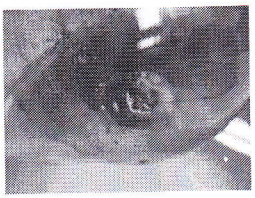
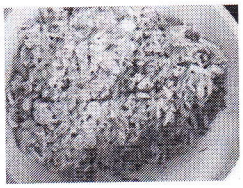
จากการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างสารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียก่อโรคในหมึกแปรรูป ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรผสมในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค

1.1 ลักษณะของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ พริกชี้ฟ้าและตะไคร้ พบว่าพริกชี้ฟ้าลักษณะก่อนตากแห้งผลเรียวยาว สีแดงสด เมื่อนำมาตากแห้งลักษณะผลแห้ง ย่น สีแดงลักษณะพริกชี้ฟ้าในเอทานอล 95% สารละลายมีสีแดง เมื่อสกัดเสร็จได้สารข้นหนืดสีแดง ส่วนตะไคร้ลักษณะก่อนตากแห้งลำต้นมีสีขาว ใบสีขาว ลักษณะตะไคร้ในเอทานอล 95% สารละลายมีสีเขียว ลักษณะหลังสกัดเสร็จได้สารข้นหนืดสีเขียวเข้ม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

ชนิด	ลักษณะตัวอย่าง	ลักษณะสารสกัดใน เอทานอล 95%	ลักษณะสารสกัด เมื่อสกัดเสร็จ
พริกชี้ฟ้า	ปั่นให้เป็นผง สีแดง	สารละลายสีแดง	สารข้นหนืดสีแดงเข้มข้น
			
ตะไคร้	หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปั่นให้เป็นผง	สารละลายสีเขียว	สารข้นหนืด สีเขียวเข้ม
			

1.2 ผลสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียก่อโรค (MRSA T18, *P. aeruginosa* DS001 และ *E. tarda* biogroup 1 DS002) ในหมึกแปรรูป

1.2.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA พบว่าชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.57 \pm 0.23 \times 10^5$ ถึง $7.85 \pm 0.06 \times 10^5$ CFU/g ในวันแรกของการทดลอง หลังจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการทดลอง 28 วัน และในวันสุดท้ายของการทดลองเมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียแต่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสม (ชุดการทดลองที่ 4, 6 และ 8) กับชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียและเติมสารสกัดสมุนไพรผสม (ชุดการทดลองที่ 5, 7 และ 9) พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ไม่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป (CFU/g)

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)						
	0	2	4	7	14	21	28
T1	$4.00 \pm 0.40 \times 10^{5\ b,2}$	$2.23 \pm 0.65 \times 10^{5\ b,3}$	$4.30 \pm 0.40 \times 10^{5\ c,2}$	$6.00 \pm 0.30 \times 10^{5\ a,1}$	$2.26 \pm 0.75 \times 10^{5\ c,3}$	$2.11 \pm 0.15 \times 10^{5\ b,3}$	$2.18 \pm 0.11 \times 10^{5\ c,3}$
T2	$7.85 \pm 0.06 \times 10^{5\ a,1}$	$2.96 \pm 0.04 \times 10^{5\ b,2}$	$6.67 \pm 1.00 \times 10^{5\ b,1}$	$1.27 \pm 0.09 \times 10^{5\ c,3}$	$1.89 \pm 0.23 \times 10^{5\ c,23}$	$2.41 \pm 0.02 \times 10^{5\ b,2}$	$2.36 \pm 0.25 \times 10^{5\ bc,2}$
T3	$6.30 \pm 1.00 \times 10^{5\ a,1}$	$3.73 \pm 1.15 \times 10^{5\ b,2}$	$3.30 \pm 0.20 \times 10^{5\ c,2}$	$2.45 \pm 0.35 \times 10^{5\ c,23}$	$2.55 \pm 0.29 \times 10^{5\ c,23}$	$1.24 \pm 0.16 \times 10^{5\ c,3}$	$2.13 \pm 0.22 \times 10^{5\ c,23}$
T4	$7.55 \times \pm 0.65\ 10^{5\ a,1}$	$8.10 \pm 1.00 \times 10^{5\ a,1}$	$6.30 \pm 0.90 \times 10^{5\ b,1}$	$4.67 \pm 0.38\ \times 10^{5\ ab,2}$	$2.18 \pm 0.27 \times 10^{5\ c,3}$	$3.57 \pm 0.13 \times 10^{5\ ab,2}$	$2.74 \pm 0.21 \times 10^{5\ b,3}$
T5	$1.57 \pm 0.23 \times 10^{5\ c,5}$	$2.17 \pm 0.09 \times 10^{5\ b,4}$	$9.67 \pm 8.39 \times 10^{5\ a,1}$	$2.11 \pm 0.19 \times 10^{5\ c,34}$	$3.15 \pm 0.21 \times 10^{5\ ab,2}$	$3.43 \pm 0.22 \times 10^{5\ ab,2}$	$2.74 \pm 0.18 \times 10^{5\ b,34}$
T6	$1.81 \pm 0.25 \times 10^{5\ c,3}$	$2.52 \pm 0.27 \times 10^{5\ b,2}$	$4.70 \pm 0.52 \times 10^{5\ c,1}$	$5.15 \pm 0.95 \times 10^{5\ a,1}$	$4.24 \pm 0.08 \times 10^{5\ a,1}$	$4.27 \pm 1.11 \times 10^{5\ a,1}$	$3.38 \pm 0.14 \times 10^{5\ ab,12}$
T7	$1.60 \pm 0.14 \times 10^{5\ c,3}$	$1.55 \pm 0.12 \times 10^{5\ c,3}$	$8.13 \pm 0.71 \times 10^{5\ a,1}$	$4.13 \pm 0.25 \times 10^{5\ b,2}$	$4.23 \pm 0.81 \times 10^{5\ a,2}$	$4.07 \pm 0.02 \times 10^{5\ a,2}$	$4.31 \pm 0.19 \times 10^{5\ a,2}$
T8	$3.90 \pm 0.70 \times 10^{5\ b,1}$	$3.15 \pm 1.15 \times 10^{5\ b,1}$	$3.70 \pm 0.60 \times 10^{5\ c,1}$	$3.93 \pm 0.35 \times 10^{5\ b,1}$	$2.58 \pm 0.32 \times 10^{5\ c,2}$	$3.42 \pm 0.11 \times 10^{5\ ab,1}$	$2.65 \pm 0.08 \times 10^{5\ b,2}$
T9	$3.13 \pm 1.40 \times 10^{5\ b,1}$	$2.15 \pm 0.55 \times 10^{5\ b,1}$	$3.00 \pm 0.30 \times 10^{5\ c,1}$	$2.04 \pm 0.24 \times 10^{5\ c,2}$	$2.40 \pm 0.39 \times 10^{5\ c,2}$	$2.52 \pm 0.16 \times 10^{5\ b,1}$	$2.54 \pm 0.12 \times 10^{5\ b,1}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

T1: ไม่เติมเชื้อและเติมน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)

T2: ไม่เติมเชื้อและเติมเอทานอล 35% (v/v) (ชุดควบคุมที่ 2)

T3: ไม่เติมเชื้อและเติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ (ชุดควบคุมที่ 3)

T4: เติม MRSA T18 และไม่เติมสารสกัด

T5: เติม MRSA T18 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

T6: เติม *P. aeruginosa* DS001 และไม่เติมสารสกัด

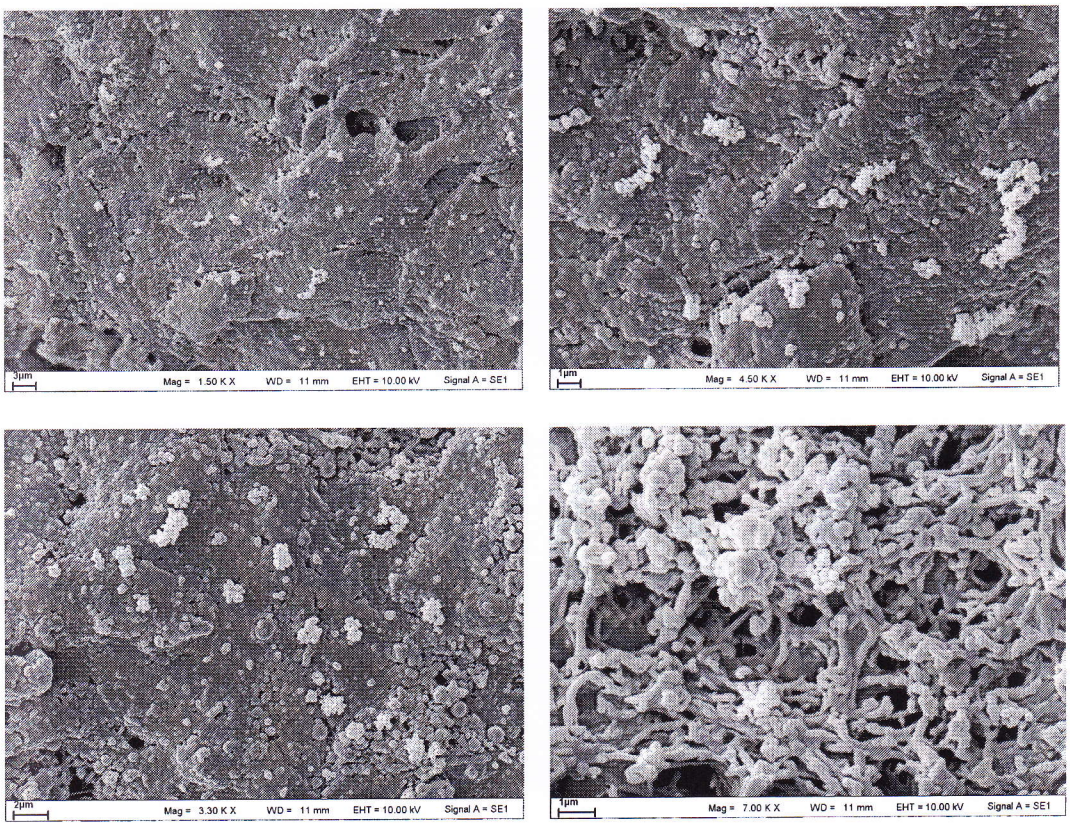
T7: เติม *P. aeruginosa* DS001 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

T8: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และไม่เติมสารสกัด

T9: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

1.2.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย MRSA T18 ในหมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย MRSA T18 ในหมึกแปรรูปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA พบการเจริญของ MRSA T18 ในชุดการทดลองที่ 4 (ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสมและเติมแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18) และชุดการทดลองที่ 5 (เติมสารสกัดสมุนไพรผสมและเติมแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18) เท่านั้น โดยพบปริมาณแบคทีเรีย MRSA T18 อยู่ในช่วง $1.70 \pm 0.72 \times 10^3$ ถึง $1.43 \pm 0.95 \times 10^3$ CFU/g ในวันแรกของการทดลอง และมีปริมาณอยู่ในช่วง $2.30 \pm 0.58 \times 10^3$ ถึง $1.50 \pm 0.57 \times 10^2$ CFU/g ในวันที่ 21 ของการทดลอง ส่วนในวันสุดท้ายของการทดลองตรวจพบแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18 ได้เฉพาะในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18 แต่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสมเท่านั้น โดยพบในปริมาณเท่ากับ $1.83 \pm 0.60 \times 10^3$ CFU/g เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณแบคทีเรีย MRSA T18 ที่พบในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ในวันแรกของการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าตรวจไม่พบแบคทีเรีย MRSA T18 ในชุดการทดลองที่ 5 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA T18 ที่เติมในหมึกแปรรูป ดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 6 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ และเติมแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย MRSA T18 ในหมึกแปรรูป (CFU/g)

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)						
	0	2	4	7	14	21	28
T1	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$
T2	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$
T3	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$
T4	$1.70 \pm 0.72 \times 10^{3\ a,1}$	$1.55 \pm 0.45 \times 10^{3\ a,1}$	$2.00 \pm 0.10 \times 10^{3\ a,1}$	$1.95 \pm 0.55 \times 10^{3\ a,1}$	$2.37 \pm 0.42 \times 10^{3\ a,1}$	$2.30 \pm 0.58 \times 10^{3\ a,1}$	$1.83 \pm 0.60 \times 10^{3\ a,1}$
T5	$1.43 \pm 0.95 \times 10^{3\ a,1}$	$6.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ b,2}$	$6.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ b,2}$	$1.35 \pm 0.57 \times 10^{3\ a,1}$	$1.50 \pm 0.57 \times 10^{2\ b,2}$	$1.50 \pm 0.57 \times 10^{2\ b,2}$	$< 10^{b,3}$
T6	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$
T7	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$
T8	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$
T9	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

T1: ไม่เติมเชื้อและเติมน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)

T2: ไม่เติมเชื้อและเติมเอทานอล 35% (v/v) (ชุดควบคุมที่ 2)

T3: ไม่เติมเชื้อและเติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ (ชุดควบคุมที่ 3)

T4: เติม MRSA T18 และไม่เติมสารสกัด

T5: เติม MRSA T18 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

T6: เติม *P. aeruginosa* DS001 และไม่เติมสารสกัด

T7: เติม *P. aeruginosa* DS001 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

T8: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และไม่เติมสารสกัด

T9: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

1.2.3 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *P. aeruginosa* DS001

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *P. aeruginosa* DS001 ในหมึกแปรรูปบนอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย PIA พบว่ามีการเจริญของ *P. aeruginosa* DS001 ในชุดการทดลองที่ 6 (ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสม แต่เติมแบคทีเรียก่อโรค *P. aeruginosa* DS001) ในวันแรกของการทดลองเท่านั้น ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรีย *P. aeruginosa* DS001 เท่ากับ 2.50 $\pm 1.52 \times 10^2$ CFU/g ในขณะที่ชุดการทดลองอื่น ๆ ตรวจไม่พบ *P. aeruginosa* DS001 ตั้งแต่วันแรกของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *P. aeruginosa* DS001 ในหมึกแปรรูป (CFU/g)

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)						
	0	2	4	7	14	21	28
T1	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T2	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T3	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T4	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T5	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T6	$2.50 \pm 1.52 \times 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$	$< 10^{2}$
T7	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T8	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
T9	$< 10^{b}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: ไม่เติมเชื้อและเติมน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)
T2: ไม่เติมเชื้อและเติมเอทานอล 35% (v/v) (ชุดควบคุมที่ 2)
T3: ไม่เติมเชื้อและเติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ (ชุดควบคุมที่ 3)
T4: เติม MRSA T18 และไม่เติมสารสกัด
T5: เติม MRSA T18 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้
T6: เติม *P. aeruginosa* DS001 และไม่เติมสารสกัด
T7: เติม *P. aeruginosa* DS001 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้
T8: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และไม่เติมสารสกัด
T9: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

1.2.4 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในหมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในหมึกแปรรูป พบการเจริญของ *E. tarda* biogroup 1 DS002 เฉพาะในชุดการทดลองที่เติม *E. tarda* biogroup 1 DS002 เท่านั้น (ชุดการทดลองที่ 8 และ 9) ซึ่งพบว่าปริมาณ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในวันแรกของการทดลองมีค่าเท่ากับ $1.53\pm0.51\times10^{3}$ ถึง $1.87\pm0.60\times10^{3}$ CFU/g ในชุดการทดลองที่ 9 ซึ่งเติม *E. tarda* biogroup 1 DS002 และเติมสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ พบว่าการเจริญของ *E. tarda* biogroup 1 DS002 มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการทดลอง จนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง พบปริมาณ *E. tarda* biogroup 1 DS002 มีค่าเท่ากับ $1.00\pm0.00\times10^{2}$ CFU/g หลังจากนั้นไม่พบการเจริญของ *E. tarda* biogroup 1 DS002 อีกในชุดการทดลองดังกล่าวจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ 8 ซึ่งเติม *E. tarda* biogroup 1 DS002 และไม่เติมสารสกัดสมุนไพรผสม ในวันสุดท้ายของการทดลองพบปริมาณ *E. tarda* biogroup 1 DS002 เท่ากับ $3.00\pm1.00\times10^{2}$ CFU/g ซึ่งการเจริญของ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าการเติมสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ทำให้ปริมาณ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในหมึกแปรรูป ดังแสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรีย *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในหมึกแปรรูป (CFU/g)

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการทดลอง (วัน)						
	0	2	4	7	14	21	28
T1	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T2	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T3	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T4	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T5	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T6	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T7	$< 10^{b}$	$< 10^{c}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$	$< 10^{b}$
T8	$1.53 \pm 0.51 \times 10^{3\ a,1}$	$1.10 \pm 0.20 \times 10^{3\ a,1}$	$3.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ a,2}$	$3.50 \pm 0.58 \times 10^{2\ a,2}$	$2.00 \pm 0.00 \times 10^{2\ a,2}$	$2.67 \pm 0.58 \times 10^{2\ a,2}$	$3.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ a,2}$
T9	$1.87 \pm 0.60 \times 10^{3\ a,1}$	$3.67 \pm 2.08 \times 10^{2\ b,2}$	$3.33 \pm 1.52 \times 10^{2\ a,2}$	$1.67 \pm 0.58 \times 10^{2\ a,2}$	$1.00 \pm 0.00 \times 10^{2\ a,2}$	$< 10^{b,3}$	$< 10^{b,3}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

T1: ไม่เติมเชื้อและเติมน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)

T2: ไม่เติมเชื้อและเติมเอทานอล 35% (v/v) (ชุดควบคุมที่ 2)

T3: ไม่เติมเชื้อและเติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ (ชุดควบคุมที่ 3)

T4: เติม MRSA T18 และไม่เติมสารสกัด

T5: เติม MRSA T18 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

T6: เติม *P. aeruginosa* DS001 และไม่เติมสารสกัด

T7: เติม *P. aeruginosa* DS001 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

T8: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และไม่เติมสารสกัด

T9: เติม *E. tarda* biogroup 1 DS 002 และเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป (CFU/g) พบแบคทีเรียจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Bacillus circulans* strain 1, *Bacillus alcalophilus* strain 1/ *Bacillus lentus* strain 1, *Bacillus firmus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus pantothenticus*, *Bacillus alcalophilus* strain 2 / *Bacillus lentus* strain 2, *Bacillus circulans* strain 2, *Bacillus thuringiensis* strain 1, *Bacillus laterosporus* และ *Bacillus thuringiensis* strain 2 โดยแบคทีเรียที่พบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป (CFU/g)

ชนิดของแบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการทดลอง (วัน)																																
	0									2										4										7				
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
1. *Bacillus circulans* strain 1	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. *Bacillus alcalophilus* strain 1 , *Bacillus lentus* strain 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
3. *Bacillus firmus*	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. *Bacillus pasteurii*	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. *Bacillus pantothenticus*	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. *Bacillus alcalophilus* strain 2 , *Bacillus lentus* strain 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7. *Bacillus circulans* strain 2	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8. *Bacillus thuringiensis* strain 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9. *Bacillus laterosporus*	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. *Bacillus thuringiensis* strain 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ: + คือ พบเชื้อเจริญ, - คือ ไม่พบเชื้อเจริญ

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป (CFU/g) (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการทดลอง (วัน)																												
	14									21										28									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9		
1. *Bacillus circulans* strain 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2. *Bacillus alcalophilus* strain 1 , *Bacillus lentus* strain 1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3. *Bacillus firmus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4. *Bacillus pasteurii*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5. *Bacillus pantothenticus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6. *Bacillus alcalophilus* strain 2 , *Bacillus lentus* strain 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7. *Bacillus circulans* strain 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8. *Bacillus thuringiensis* strain 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9. *Bacillus laterosporus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10. *Bacillus thuringiensis* strain 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

หมายเหตุ: + คือ พบเชื้อเจริญ, - คือ ไม่พบเชื้อเจริญ

2. การประเมินเบื้องต้นถึงความเหมาะสมของการเติมสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูป

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป พบว่า ในขั้นตอนหลังล้างทำความสะอาดพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.00\pm0.00\times10^{2}$ ถึง $2.67\pm0.57\times10^{2}$ CFU/g และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการแปรรูป (หลังตากแดดครั้งที่ 2) พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $<10^{2}$ ถึง $2.00\pm0.00\times10^{2}$ CFU/g โดยในแต่ละกระบวนผลิตหมึกแปรรูปพบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกตัวที่ 2 และ 3 มากที่สุดในขั้นตอนหลังตากแดดเท่ากับ $3.33\pm1.15\times10^{2}$ และ $3.67\pm0.58\times10^{2}$ CFU/g ตามลำดับ และพบน้อยที่สุดในขั้นตอนหลังตากแดดครั้งที่ 2 ในหมึกตัวอย่างที่ 1 เท่ากับ $<10^{2}$ CFU/g ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับขั้นตอนอื่น ๆ

ต่อมาทำการศึกษาถึงการเปิดถุงบรรจุผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปไว้เป็นระยะเวลา 25 วัน พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ $1.67\pm0.21\times10^{3}$ ถึง $2.43\pm0.45\times10^{3}$ CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วนการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในเครื่องปรุงรส พบว่ามีปริมาณเท่ากับ $1.33\pm0.58\times10^{1}$ CFU/mL

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในแต่ละกระบวนผลิตหมึกแปรรูป (48 ชั่วโมง)

กระบวนผลิตหมึกแปรรูป	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)		
	หมึกตัวอย่างที่ 1	หมึกตัวอย่างที่ 2	หมึกตัวอย่างที่ 3
หลังล้างทำความสะอาด	$2.67\pm0.57\times10^{2}$ bc,1	$1.00\pm0.00\times10^{2}$ c,2	$1.00\pm0.00\times10^{2}$ d,2
หลังแช่เครื่องปรุงรส	$1.67\pm0.00\times10^{2}$ c,1	$1.33\pm0.58\times10^{2}$ c,1	$1.33\pm0.58\times10^{2}$ d,1
หลังตากแดด	$2.33\pm0.58\times10^{2}$ bc,1	$3.33\pm1.15\times10^{2}$ c,1	$3.67\pm0.58\times10^{2}$ c,1
หลังย่าง	$5.33\pm1.53\times10^{2}$ b,1	$1.00\pm0.00\times10^{2}$ c,2	$1.33\pm0.58\times10^{2}$ d,2
หลังบด	$1.00\pm0.00\times10^{2}$ c,1	$1.00\pm0.00\times10^{2}$ c,1	$1.67\pm0.58\times10^{2}$ d,1
หลังตากแดดครั้งที่ 2	$<10^{2}$ d,1	$1.00\pm0.00\times10^{2}$ c,1	$2.00\pm0.00\times10^{2}$ cd,1
เปิดถุงบรรจุไว้ 10 วัน	$2.27\pm0.21\times10^{3}$ a,2	$2.73\pm0.15\times10^{3}$ a,1	$9.67\pm1.53\times10^{2}$ b,3
เปิดถุงบรรจุไว้ 25 วัน	$2.43\pm0.45\times10^{3}$ a,1	$2.33\pm0.32\times10^{3}$ b,12	$1.67\pm0.21\times10^{3}$ a,2

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนการผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ได้แก่ น้ำปรุงรส, หลังล้างหมึก, หลังแช่น้ำปรุงรส, หลังตากแดด, หลังย่าง, หลังบด, หลังตากแดดครั้งที่ 2, เปิดถุง 10 วัน, เปิดถุง 25 วัน และเปิดถุง 45 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 4 วงศ์ ได้แก่ Micrococcaceae (คือ *Staphylococcus carnosus* subsp. *utilis*, *S. piscifermentans* และ *Micrococus luteus/M. lylae*), Bacillaceae (คือ *Bacillus pasteurii*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. pantothenticus*, *B. badius* และ *B. insolitus*), Pseudomonadaceae (คือ *Bordetella parapertussis* CDC-No1) และ Enterobacteriaceae (คือ *Yersinia intermedia/Y. frederksenii*) โดยแบคทีเรียที่พบว่ามีการปนเปื้อนสูงที่สุดคือแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae จำนวน 6 ชนิด รองลงมาคือวงศ์ Micrococcaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae และ จำนวน 3, 1 และ 1 ชนิด ตามลำดับ และพบว่าขั้นตอนที่มีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียมากที่สุดคือขั้นตอนหลังตากแดดครั้งที่ 1 และเปิดถุง 25 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 8 ชนิด รองลงมาคือ ขั้นตอนหลังล้างหมึก, เปิดถุง 10 วัน และเปิดถุง 45 วัน พบแบคทีเรียจำนวน 7, 6 และ 5 ชนิด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในแต่ละขั้นตอนการผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

แบคทีเรีย	น้ำปรุงรส	หลังล้างหมึก	หลังแช่น้ำปรุงรส	หลังตากแดดครั้งที่ 1	หลังย่าง	หลังนวด	หลังตากแดดครั้งที่ 2	เปิดถุง 10 วัน	เปิดถุง 25 วัน	เปิดถุง 45 วัน
Family Micrococcaceae										
Staphylococcus carnosus subsp. *utilis*	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Staphylococcus piscifermentans	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Micrococus luteus/ Micrococcus lylae	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Family Bacillaceae										
Bacillus pasteurii	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B. brevis	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
B. firmus	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
B. pantothenticus	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
B. badius	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
B. insolitus	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Family Pseudomonadaceae										
Bordetella parapertussis CDC-No1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Family Enterobacteriaceae										
Yersinia intermedia/ Yersinia frederksenii	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ พบเชื้อเจริญ, - คือ ไม่พบเชื้อเจริญ

สรุปผลการประเมินเบื้องต้นถึงความเหมาะสมของการเติมสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูป

จากผลการประเมินเบื้องต้นถึงความเหมาะสมของการเติมสารสกัดสมุนไพรในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแปรรูป โดยการทดลองผลิตหมึกแปรรูปแล้วทำการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิต ได้แก่ หลังล้างทำความสะอาด หลังแช่เครื่องปรุงรส หลังตากแดด หลังย่าง หลังบด หลังตากแดดครั้งที่ 2 และหลังการเปิดถุงบรรจุผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน 10 และ 25 วัน ผลจากการทดลองพบว่า หมึกตัวอย่างที่ 2 และ 3 ในทุกกระบวนการผลิตพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนหมึกตัวอย่างที่ 1 พบว่าหลังเสร็จสิ้นกระบวนการตากแดดครั้งที่ 2 พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดน้อยที่สุด และผลจากการเปิดถุงบรรจุผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปซึ่งเปรียบเสมือนการเปิดถุงบรรจุผลิตภัณฑ์เพื่อรอการจำหน่ายในชีวิตประจำวันของการค้าขาย พบว่าภายในระยะเวลา 25 วัน แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในทั้ง 3 ตัวอย่างมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่คณะผู้วิจัยผลิตขึ้นเองในครั้งนี้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่จำหน่ายตามท้องตลาดที่พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 10^5 CFU/g (ผลการทดลองของโครงการวิจัยในปีงบประมาณ 2557) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในกระบวนการผลิตหมึกแปรรูปสามารถเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และอาจจะเกิดการปนเปื้อนจากผู้ขายในขณะบรรจุหีบห่อ ซึ่งอาจจะใช้มือที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียมาจับต้องผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษาตามระยะเวลาของการตั้งวางสินค้าเพื่อรอการจำหน่ายนั่นเอง ดังนั้นกระบวนการที่เหมาะสมในการเติมสารสกัดสมุนไพรคือ ภายหลังจากที่มีการตากแดดครั้งที่ 2 หรือครั้งสุดท้ายก่อนจะจัดส่งจำหน่ายนั่นเอง

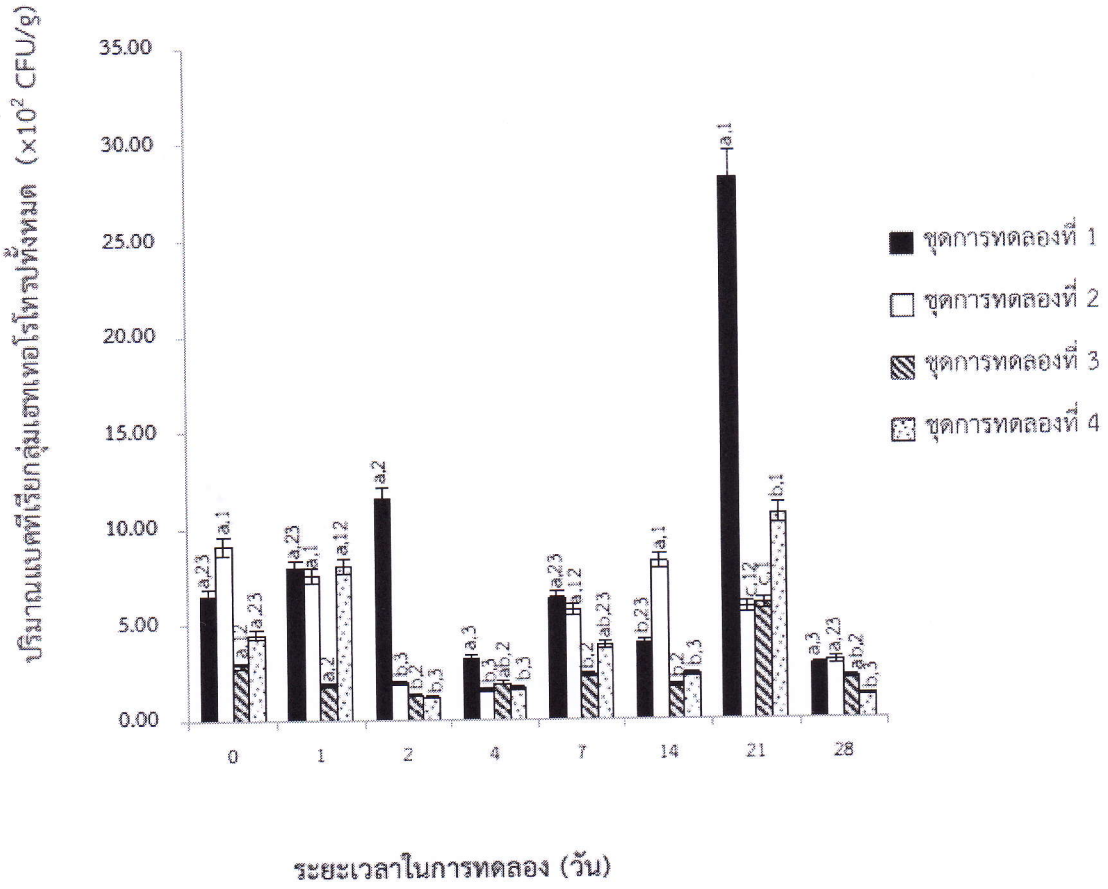
3. การประยุกต์ใช้สารสกัดพืชสมุนไพรในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแห้งและแปรรูป

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป พบว่า ในวันแรกของการจำลองการจัดจำหน่ายมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.78\pm0.51\times10^{2}$ ถึง $2.82\pm0.60\times10^{3}$ CFU/g ในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่มีการสเปรย์น้ำกลั่น แทนสารสกัด พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดโดยเฉลี่ยเพิ่มมากขึ้นจากวันแรกของการทดลองจนถึงวันที่ 2 ของการทดลอง และน้อยลงในวันที่ 4 ของการทดลองแต่หลังจากวันที่ 4 ของการทดลองพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่วนชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่มีการสเปรย์เอทานอล 35% แทนสารสกัด พบว่าในวันที่ 1 ของการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดโดยเฉลี่ยลดลง และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 7 ของการทดลอง ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีการสเปรย์สารสกัดจากพริกและตะไคร้ที่ความเข้มข้น 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่า ในวันแรกของชุดการทดลองที่เติมสารสกัดความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดโดยเฉลี่ยน้อยกว่าความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เล็กน้อยจนกระทั่งวันที่ 14 ของการทดลองที่พบว่าชุดที่เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดโดยเฉลี่ยสูงกว่าชุดที่เติมสารสกัดความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในหมึกแปรรูปโดยเฉลี่ยของชุดการทดลองที่มีการสเปรย์สารสกัดจากพริกและตะไคร้ที่ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าลดลงตั้งแต่วันแรกของการทดลองและมีผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกชุดการศึกษาในครั้งนี้ แสดงดังตารางที่ 9 และภาพที่ 7

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในหมึกแปรรูปหน่วย CFU/g

ชุดกการทดลอง	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (จำลองการขาย; วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_4	D_7	D_{14}	D_{21}	D_{28}
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	$6.50\pm0.93\times10^{2\ a,23}$	$7.93\pm4.27\times10^{2\ a,23}$	$1.16\pm0.75\times10^{3\ a,2}$	$3.22\pm0.19\times10^{2\ a,3}$	$6.34\pm3.95\times10^{2\ a,23}$	$4.00\pm2.03\times10^{2\ b,23}$	$2.82\pm0.60\times10^{3\ a,1}$	$2.78\pm0.51\times10^{2\ a,3}$
ชุดควบคุม (เอทานอล 35%)	$9.11\pm7.01\times10^{2\ a,1}$	$7.54\pm2.34\times10^{2\ a,1}$	$1.94\pm0.42\times10^{2\ b,3}$	$1.55\pm0.39\times10^{2\ b,3}$	$5.67\pm2.08\times10^{2\ a,12}$	$8.21\pm2.58\times10^{2\ a,1}$	$5.78\pm0.51\times10^{2\ c,12}$	$3.00\pm0.88\times10^{2\ a,23}$
160 mg/mL	$2.89\pm1.83\times10^{2\ a,12}$	$1.84\pm0.17\times10^{2\ a,2}$	$1.28\pm0.25\times10^{2\ b,2}$	$1.89\pm1.26\times10^{2\ ab,2}$	$2.33\pm1.45\times10^{2\ b,2}$	$1.78\pm0.84\times10^{2\ b,2}$	$6.00\pm4.58\times10^{2\ c,1}$	$2.11\pm1.02\times10^{2\ ab,2}$
320 mg/mL	$4.50\pm3.11\times10^{2\ a,23}$	$8.07\pm6.22\times10^{2\ a,12}$	$1.17\pm0.29\times10^{2\ b,3}$	$1.67\pm0.67\times10^{2\ b,3}$	$3.84\pm0.84\times10^{2\ ab,23}$	$2.33\pm2.03\times10^{2\ b,3}$	$1.00\pm0.39\times10^{3\ b,1}$	$1.22\pm0.19\times10^{2\ b,3}$

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
Treatment 1 ไม่สเปรย์สารสกัด แต่สเปรย์น้ำกลั่นแทนสารสกัด
Treatment 2 ไม่สเปรย์สารสกัด แต่สเปรย์เอทานอล 35 % แทนสารสกัด
Treatment 3 สเปรย์สารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
Treatment 4 สเปรย์สารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในหมึกแปรรูปหน่วย CFU/g

จากการศึกษาชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในระหว่างการจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปโดยมีการเติมสารสกัดสมุนไพร พบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจำนวน 4 วงศ์ ได้แก่ Micrococcaceae (คือ *Staphylococcus fleurettii*), Bacillaceae (คือ *B. alcalophilus*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. pasteurii*, *B. circulans*, *B. lentimorbus* และ *B. laterosporus*), Pseudomonadaceae (คือ *Bordetella parapertussis* CDC-No1 และ *Neisseria weaver*) และ Enterobacteriaceae (คือ *Escherichia coli* และ *Yersinia intermedia/Y. frederksenii*) โดยแบคทีเรียที่พบว่ามีการปนเปื้อนสูงที่สุดคือแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae จำนวน 9 ชนิด รองลงมาคือวงศ์ Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae และ Micrococcaceae จำนวน 2, 2 และ 1 ชนิด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในระหว่างการจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

แบคทีเรีย	ชุดการทดลอง																													
	น้ำกลั่น								เอทานอล 35%								สารสกัดพริกและตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มก./มล.								สารสกัดพริกและตะไคร้ ความเข้มข้น 320 มก./มล.							
	0	1	2	4	7	14	21	28	0	1	2	4	7	14	21	28	0	1	2	4	7	14	21	28	0	1	2	4	7	14	21	28
Family Micrococcaceae																																
Staphylococcus fleurettii	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Family Bacillaceae																																
Bacillus alcalophilus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B. firmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
B. insolitus	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
B. megaterium	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
B. stearothermophilus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B. pasteurii	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
B. circulans	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. lentimorbus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B. laterosporus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Family Pseudomonadaceae																																
Bordetella parapertussis CDC-No1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Neisseria weaver	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Family Enterobacteriaceae																																
Escherichia coli	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia intermedia/ Yersinia frederksenii	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ พบเชื้อเจริญ, - คือ ไม่พบเชื้อเจริญ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกขี้ฟ้าและตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เติมในหมึกแปรรูป สามารถควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดไม่ให้เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค MRSA T18 และ *E. tarda* biogroup 1 DS002 ในหมึกแปรรูปได้

2. จากผลการศึกษาพบว่าในกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียมาจากทั้งน้ำปรุงรส โดยเฉพาะจากกระบวนการล้างหมึกและกระบวนในการตากแดดซึ่งพบการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียมากที่สุดซึ่งรวมทั้งสามารถเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกในขณะดำเนินการเหล่านี้ และอาจจะเกิดการปนเปื้อนจากผู้ขายในขณะบรรจุหีบห่อ ซึ่งอาจจะใช้มือที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียมาจับต้องผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษาตามระยะเวลาของการตั้งวางสินค้าเพื่อรอการจำหน่ายนั่งเอง แต่ถึงแม้จะมีการปนเปื้อนตลอดระยะเวลาในการผลิตหมึกแปรรูปพบว่า การตากแดดครั้งสุดท้ายสามารถกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพและพบว่ามีการปนเปื้อนในขั้นตอนต่อจากนี้คือขั้นตอนของการจัดจำหน่ายสูงที่สุด ดังนั้นกระบวนการที่เหมาะสมในการเติมสารสกัดสมุนไพรคือ ภายหลังจากที่มีการตากแดดครั้งที่ 2 หรือครั้งสุดท้ายก่อนจะจัดส่งจำหน่ายนั่นเอง

3. จากการเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกขี้ฟ้ากับตะไคร้ภายหลังจากที่มีการตากแดดครั้งสุดท้ายในกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป ผลการศึกษาผลของสารสกัดผสมระหว่างพริกขี้ฟ้ากับตะไคร้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่พบในการจำลองการจำหน่ายหมึกแปรรูปโดยการเปิดปากถุงทิ้งไว้ โดยการสเปรย์สารสกัดจากพริกและตะไคร้ความเข้มข้น 160 หรือ 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วทำการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดระหว่างการจำลองการจัดจำหน่าย พบว่าตลอดระยะเวลาการทดลองพบว่าสารสกัด160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมจุลินทรีย์ในหมึกแปรรูปได้ดีตลอดระยะเวลาการศึกษา 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ 3 ชุดการศึกษา โดยแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนทำการจำลองการจำหน่ายหมึกแปรรูปโดยการเปิดปากถุงทิ้งไว้จากทุกชุดการทดลอง ได้แก่ *Staphylococcus fleurettii*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus laterosporus*, *Bordetella parapertussis* CDC-No1, *Neisseria weaver*, *Escherichia coli* และ *Yersinia intermedia/ Yersinia frederksenii* และในวันที่ 21 ของการจำลองการจำหน่ายหมึกแปรรูปโดยการเปิดปากถุงทิ้งไว้พบว่าชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพริกและตะไคร้ความเข้มข้น 160 มก/มล สามารถลดแบคทีเรียจาก 7 ชนิด จากวันแรกของการศึกษาให้เหลือเพียง 5 ชนิดซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus fleurettii*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus stearothermophilus* และ *Bacillus pasteurii* ส่วนในวันที่ 28 ของการศึกษาพบการปนเปื้อนด้วยเชื้อราทุกชุดการทดลอง

4. ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหมึกแปรรูปและควรเติมหลังจากขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการผลิตหมึกแปรรูปภายใน 21 วันของการจำลองการจำหน่ายหมึกแปรรูปโดยการเปิดปากถุงตลอด 21 วัน

อภิปรายผลการทดลอง

ปัญหาทางสาธารณสุขเป็นปัญหาที่มีความสำคัญยิ่ง ในปัจจุบันพบว่าความเจ็บป่วยอันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและสารพิษที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถช่วยลดปัญหาการเกิดโรคระบาดจากการบริโภคอาหารได้ (Kiran et al., 2008; Gao et al., 2011; Sultanbawa, 2011) แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคมีความกังวลต่อผลข้างเคียงของการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร (Sultanbawa, 2011; Lucera et al., 2012; Sharma et al., 2012) จึงมีความสนใจในการนำสารสกัดจากพืชมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแทนสารเคมีหรือสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น (Tyagi and Malik, 2011; Lucera et al., 2012) ซึ่งสารสกัดจากพืชและสมุนไพรหลายชนิดมีคุณสมบัติทางยา รวมทั้งยังมีศักยภาพเพียงพอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกัดบูดในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ได้หลายประเภท (Beuchat, 1994; Nakatani, 1994; Cutler, 1995; Cichewicz et al., 1996; Nguefack et al., 2009)

จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ (Chaisawadi et al., 2005; Gopinth et al., 2013; Sethi et al., 2013; Witkowska et al., 2013) รวมทั้งมีรายงานว่าสารสกัดเดี่ยวจากพริกและตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร (Santos et al., 2012; Ewansiha et al., 2012) การใช้สารประกอบหลายชนิดที่มีกลไกในการออกฤทธิ์แตกต่างกันร่วมกันอาจจะสามารถทำให้การยับยั้งแบคทีเรียมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยมีการรายงานว่าการใช้สารออกฤทธิ์ทั้งหมดที่อยู่ในสมุนไพรมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ที่สูงกว่าการใช้ปริมาณที่เท่ากันของสารออกฤทธิ์เพียงชนิดเดียวที่อยู่ในสมุนไพร (Williamson, 2001; Nahrstedt and Butterweck, 2010) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องมาจากสารสกัดเดี่ยวจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่สูงมาก ทำให้การนำสารสกัดเดี่ยวจากพืชสมุนไพรมาใช้แทนสารปฏิชีวนะยังมีอยู่น้อยมากในปัจจุบัน (Adwan and Mhanna, 2008)ซึ่งการใช้สารสกัดผสมของพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่อาจจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพโดยรวมของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยในรายงานการศึกษาจำนวนหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งที่สูงกว่าการใช้สารสกัดเดี่ยวจากพืชแต่ละชนิด (Al-Bayati, 2008; Gutierrez et al., 2009; Karmegam et al., 2008; Karmegam et al., 2012; Mabrouk, 2012) โดยมีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นจากการใช้สารสกัดของพืชชนิดต่าง ๆ ร่วมกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป (Williamson, 2001; Al-Bayati, 2007;

Gutierrez et al., 2009; Kamegam et al., 2012) ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Kamatou et al. (2006) ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผสมระหว่าง *Salvia chamelaeagnea* L. และ *Leonotis leonurus* L. ในอัตราส่วนต่าง ๆ แสดงกิจกรรมการเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และการศึกษาของ Al-Bayati (2007) ที่ทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจาก *Thymus vulgaris* และ *Pimpinella anisum* ซึ่งพบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิด แสดงค่า MIC ที่น้อยกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดแยกกัน

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 (ปีที่ 2 ของการวิจัย) พบว่าสารสกัดสมุนไพรผสมของพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (32 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 1 กรัม ของตัวอย่าง) สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* DS001 และ *E. tarda* biogroup 1 DS002 แต่สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรีย MRSA T18 ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งแปรรูปไม่ให้เพิ่มขึ้นตลอดระยะการศึกษาเท่านั้น ซึ่งแบคทีเรีย MRSA T18 เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่สำคัญ โดยปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* นั้นเกิดจากหลายปัจจัย (Sandel and McKilip, 2004; Kuroda et al., 2007; Normanno et at., 2007) ซึ่งการผลิตสารพิษ Enterotoxin ที่ทนความร้อนของแบคทีเรียชนิดนี้เป็นปัจจัยความรุนแรงที่เด่นชัดของการปรากฏลักษณะอาการอาหารเป็นพิษ หรือการก่อโรคทางอาหาร (Martin et al., 2004; Sandel and McKilip, 2004; Kérouanton et al., 2007) อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด(Chambers, 1997; Mee-Marquet et al., 2004; Nejma et al., 2006; Pesavento et al., 2007) จึงมีความตระหนักถึงปัญหาทางด้านสาธารณสุขจากการปนเปื้อนของ MRSA T18 ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งแปรรูป

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรผสมของพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอล เท่ากับ 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (64 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 1 กรัม ของตัวอย่าง) ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดผสมของพริกชี้ฟ้าและตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA T18 ได้จากเดิมที่ไม่สามารถฆ่าได้เมื่อใช้ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดผสมจากพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA T18 ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งในการศึกษาของ Jafari et al. (2012) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้ที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* รวมทั้งการศึกษาของ Zare et al. (2012) ที่รายงานว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดหญ้าเกล็ดปลา (*Lippia nodiflora* L.) ทำให้กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน

การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นนั้น ปริมาณของสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ในสารสกัดก็จะมีระดับที่สูงขึ้น ซึ่งปริมาณของสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในสารสกัดจะทำให้ความสามารถของสารเมแทบอไลท์เหล่านั้นในการยับยั้งจุลินทรีย์มีกิจกรรมที่สูงขึ้นตามไปด้วย (Setha et al., 2014) แม้ว่าการใช้สารสกัดความเข้มข้นสูงมาก ๆ จะสามารถเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ก็ตาม การใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงเกินไปก็อาจทำให้เกิดผลในเชิงลบได้เช่นกัน เนื่องจากอาจไปรบกวนความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ของสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Pelczar et al., 1993) ประสิทธิภาพของกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงต้องคำนึงถึงระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเหมาะสม โดยในการศึกษาครั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าที่ระดับความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดผสมของพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอลมีความเพียงพอในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย MRSA T18 ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งแปรรูปซึ่งกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอลนั้นเกิดจากการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารออกฤทธิ์กลุ่มต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด

การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารประกอบทั้งกลุ่มหลักและกลุ่มรองจากสารสกัดของพืชแต่ละชนิดนั้นแสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สูงมากกว่าการใช้สารประกอบกลุ่มใดเพียงกลุ่มเดียวในการนำมาใช้ยับยั้ง (Burt, 2004) สารออกฤทธิ์กลุ่มต่าง ๆ จากทั้งพริกชี้ฟ้าและตะไคร้พบว่ามีสารประกอบแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน โดยในพริกชี้ฟ้ามีสารกลุ่มฟีโนลิกเป็นองค์ประกอบหลัก (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550) ได้แก่ Flavonoid, Cinnamic acid, m-coumaric acid และ o-coumaric acid (Dorantes et al., 2000; Pavlovic et al., 2012) ส่วนในตะไคร้มีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่ม Monoterpene โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Citral ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุดในตะไคร้ (Ganjewala et al., 2012) การทำงานของสารกลุ่มต่าง ๆ ทั้งจากพริกชี้ฟ้าและตะไคร้นั้นมีการออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายต่าง ๆ ของจุลินทรีย์โดยสารกลุ่มฟีโนลิกนั้นจะจับที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีผลทำให้ผนังเซลล์เสียรูปร่างเกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการแทรกซึมของสารสกัดผ่านเข้าไปยังตำแหน่งที่สำคัญภายในเซลล์แบคทีเรียทำให้มีผลไปรบกวนความเสถียรของชั้น Phospholipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์ส่วนประกอบโครงสร้างเซลล์ (Kim et al, 1995; Lin et al., 2004; Sikkema et al., 1995) ส่วนสารประกอบ Citral และอนุพันธุ์ของสารประกอบ citral ที่มีผลต่อทั้งไซโตรพลาสมิกและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดการแสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Somolinos et al., 2010) การออกฤทธิ์ของสารประกอบแต่ละกลุ่มจากพืชทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนั้นอาจจะทำงานร่วมกันและไปมีผลต่อบริเวณเป้าหมายที่อยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ 1 ตำแหน่ง หรือหลายตำแหน่ง โดยการมีผลของสารประกอบที่บริเวณต่าง ๆ ในเซลล์จุลินทรีย์นั้นสามารถแสดงกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงกว่าการใช้สารสกัดจากพืชเพียงชนิดเดียว ซึ่งประสิทธิภาพที่เพิ่มสูงขึ้นจากการทำงานร่วมกันของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดเรียกว่า Synergistic effect (Adwan et al., 2006)

การผลิตอาหารทะเลแห้งเริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบซึ่งคืออาหารทะเลสด เช่น การคัดขนาด การคัดคุณภาพ การล้าง การตัดแต่ง บางชนิดอาจมีการหมักเกลือ (Salt curing) หลังจากนั้นจึงนำมาทำแห้ง ซึ่งชาวบ้านมักใช้การตากแดด (Sun drying) เพื่อลดความชื้น และค่าวอเตอร์-แอคทิวิตี้ (Water activity) ลง จนถึงระดับที่ปลอดภัยต่อการบริโภค ลดความเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย (Microbial spoilage) ประเภทของอาหารทะเลแห้ง ได้แก่ ปลาแห้ง ปลาเค็ม กุ้งแห้งปลาหมึกแห้ง และหอยแห้ง (ศูนย์เครือข่ายอาหารครบวงจร, 2015) ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ประมงเป็นสิ่งที่สำคัญอันดับต้นๆ เนื่องจากมีการบริโภคในปริมาณมาก เป็นแหล่งโปรตีน และใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเสริมที่มีราคาถูก อีกทั้งยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการซื้อขายกันมากที่สุดในระดับนานาชาติ ซึ่งที่ผ่านมาพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคมากขึ้น (Surendraraj and Nirmala, 2008) อาหารเน่าเสีย รวมทั้งลักษณะภายนอกเสียหาย คุณสมบัติทางเคมีเปลี่ยนแปลง เช่น การเกิดออกซิเดชัน สี รสชาติ และกลิ่นของอาหารเปลี่ยนแปลงเป็นผลจากการเจริญและเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียในอาหารนั้นๆ (Gram *et al.*, 2002)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อมาจึงทำการศึกษาโดยทำการประเมินเบื้องต้นถึงความเหมาะสมในการเติมสารสกัดสมุนไพรในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแปรรูป โดยทำการทดลองผลิตหมึกแปรรูปแล้วประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิต ได้แก่ หลังล้างทำความสะอาด หลังแช่เครื่องปรุงรส หลังตากแดด หลังย่าง หลังบด หลังตากแดดครั้งที่ 2 และหลังการเปิดถุงบรรจุผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน 10, 25 และ 45 วัน พบว่าภายในระยะเวลา 25 วัน แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในทั้ง 3 ตัวอย่างมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่คณะผู้วิจัยผลิตขึ้นเองในครั้งนี้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่จำหน่ายตามท้องตลาดที่พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 10^5 CFU/g (ผลการทดลองของโครงการวิจัยในปีงบประมาณ 2557) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป สามารถเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และอาจจะเกิดการปนเปื้อนจากผู้ขายในขณะบรรจุหีบห่อ ซึ่งอาจจะใช้มือที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียมาจับต้องผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษาตามระยะเวลาของการตั้งวางสินค้าเพื่อรอการจำหน่าย

ในปี ค.ศ. 1988 Kalaimani, Gopakumar, and Nair รายงายว่าในผลิตภัณฑ์ประมงที่นำมาทำเค็มและทำแห้งจะพบจุลินทรีย์ทั้งหมด 10^3 CFU/g ขณะที่ Shakila, Lakshmanan, and Jeyasekaran ในปี ค.ศ. 2002 ได้รายงานว่าในผลิตภัณฑ์ประมงชนิดทำเค็มพบจุลินทรีย์ทั้งหมด 10^4 ถึง 10^5 CFU/g และในผลิตภัณฑ์ประมงชนิดทำแห้งพบ 10^4 CFU/g จุลินทรีย์สามารถพบได้ทั่วไป โดยปริมาณที่พบปนเปื้อนในอาหารจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการผลิต บรรจุภัณฑ์ การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร สภาพแวดล้อม รวมไปถึงผู้บริโภคเอง (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) โดยธรรมชาติสัตว์ทะเลที่จับมาเป็นอาหาร เมื่อจับได้ใหม่ๆจะมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่สูงมากถือว่ามีความสะอาดต่อการบริโภคไม่มีอันตราย เมื่อทิ้งไว้ระยะหนึ่งจุลินทรีย์จะเพิ่มปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้ยังได้รับการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกหรือจากการสัมผัสกับพื้นผิวที่ไม่

สะอาด เช่น การเก็บเกี่ยว รวบรวม การตากแดด เกลือ น้ำ ห้องเก็บภาชนะบรรจุ การบรรทุกหรือขนส่งบนเรือ รวมทั้งการปนเปื้อนจากอุปกรณ์ต่างๆ การลอกเปลือก การตัดแต่งอาหารทะเล หรือได้รับการปนเปื้อนจากการปฏิบัติงานของพนักงานหรือโรงงานผลิตที่ไม่สะอาดไม่ได้มาตรฐานและไม่ถูกสุขลักษณะ นอกจากนี้ยังอาจปนเปื้อนแบคทีเรีย ได้จากน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนน้ำเสียที่เกิดจากบ้านเรือนและชุมชน (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539; พูลศักดิ์ พุ่มวิเศษ, 2552; Saritha et al., 2012). จุลินทรีย์ในอากาศสามารถปนเปื้อนไปในอาหารได้ โดยการสัมผัสกับอาหารระหว่างการผลิต การบรรจุ การขนสูง หรือการเก็บรักษา (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) ผลิตภัณฑ์ประมงชนิดทำแห้งมีกระบวนการทำโดยการนำไปตากแดดโดยใช้ระยะเวลาหลายวัน และเป็นการทำที่อุณหภูมิห้องเป็นผลทำให้เกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ง่าย (Huang *et al.*, 2010) อีกทั้งบนผิวหนังของมนุษย์ยังมีแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ซึ่งสามารถทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ทั้งในขั้นตอนการเตรียมแปรรูปและกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Huang *et al.*, 2010)

ดังนั้นเมื่อทราบว่าขั้นตอนที่เหมาะสมในการเติมสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ ขั้นตอนก่อนการรอจัดจำหน่าย ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดจากพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่พบในการระหว่างการรอจัดจำหน่ายเนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ควรทำการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด โดยทำการสเปรย์สารสกัดจากพริกชี้ฟ้าที่ความเข้มข้น 160 หรือ 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหมึกแปรรูปหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตก่อนที่จะนำไปใส่บรรจุภัณฑ์เพื่อวางจำหน่ายแล้วทำการตรวจปริมาณแบทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ผลการศึกษาพบว่าจากการเติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ภายหลังจากที่มีการตากแดดครั้งสุดท้ายในกระบวนการผลิตหมึกแปรรูป ผลการศึกษาผลของสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่พบในการจำลองการจำหน่ายหมึกแปรรูปโดยการเปิดปากถุงทิ้งไว้ โดยการสเปรย์สารสกัดจากพริกและตะไคร้ความเข้มข้น 160 หรือ 320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วทำการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดระหว่างการจำลองการจัดจำหน่าย พบว่าตลอดระยะเวลาการทดลองพบว่าสารสกัด 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมจุลินทรีย์ในหมึกแปรรูปได้ดีตลอดระยะเวลาการศึกษา 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ 3 ชุดการศึกษา รวมทั้งพบว่าในการศึกษาครั้งนี้มีแบคทีเรียปนเปื้อนส่วนใหญ่ไม่ใช่แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในหมึกแปรรูปซึ่งได้แก่ *Staphylococcus fleurettii*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus laterosporus*, *Bordetella parapertussis* CDC-No1, *Neisseria weaver*, *Escherichia coli*, *Yersinia intermedia/ Yersinia frederksenii* และพบว่าชุดที่เติมสารสกัด 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดชนิดของแบคทีเรียจาก 7 ชนิดลดเหลือ 5 ชนิดซึ่งลดได้มากกว่าทุกชุดการศึกษา ซึ่งได้แก่ *Staphylococcus fleurettii*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus stearothermophilus* และ *Bacillus pasteurii* ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหมึกแปรรูปได้ดีที่สุดและควรเติมในขั้นตอนสุดท้ายก่อนจะส่งไปจำหน่ายภายใน 21 วันภายใต้สภาวะเปิดถุงตลอดระยะการจำหน่าย

ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าปัญหาที่ส่งผลให้อาหารทะเลไม่ได้คุณภาพและไม่ได้มาตรฐานนั้นอาจจะมีสาเหตุได้จากทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตตั้งแต่การจับ การเก็บรักษาอาหารทะเลให้สด ภาชนะบรรจุ การขนส่งไปยังโรงงานผลิต ความสะอาดของโรงงานผลิต สุขวิทยาส่วนบุคคลของผู้ปฏิบัติงาน ผู้ประกอบการหรือผู้ผลิตจะต้องให้ความสำคัญทุกขั้นตอน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการปนเปื้อนแบคทีเรียหลายชนิดและสามารถทำให้ได้อาหารทะเลไทยที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานดีขึ้นแม้จะมีการปนเปื้อนดังกล่าวจากการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นควรทำการศึกษาในงานวิจัยดังกล่าวอย่างต่อเนื่องต่อไปเพื่อทำให้สามารถประยุกต์ใช้สารสกัดดังกล่าวในการยืดอายุหมึกได้ยาวนานมากขึ้นจาก 21 วันจากการศึกษาในครั้งนี้รวมทั้งสามารถศึกษาถึงคุณค่าของการเติมสมุนไพรที่เติมลงไปเนื่องจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้มีสรรพคุณทั้งทางด้านยาและด้านการเสริมภูมิคุ้มกันอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. สาเหตุและแนวทางการแก้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในโรงงานแปรรูปนม พาสเจอร์ไรส์ [ออนไลน์] [อ้างถึง 5 มีนาคม 2553] เข้าถึงได้จาก httpc//www.foodsafetymobile.org/UserFiles/Documents/...

ชมพู่ ยิ้มโต. (2550). *การถนอมอาหาร*. กรุงเทพ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: NOBLE PRINT

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์*. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

นิจศิริ เรืองรังษี และธวัชชัย มังคละคุปต์. (2547). *สมุนไพรไทย เล่ม 1*. กรุงเทพฯ: บี เฮลท์ตี้.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, เนื้อทอง วนานุวัธ, สายสนม ประดิษฐดวง และวราภา วรพงษ์. (2532). *คุณภาพกุ้งแห้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พนมพร ภาณุทัต และสาวิตรี วทัญญูไพศาล. (2543). การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารด้วยสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพรไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. *วารสารพิษวิทยาไทย*, 25(1), 15-28.

พูลศักดิ์ พุ่มวิเศษ. (2552). การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อโรคที่ถูกต้องเพื่อสุขลักษณะที่เหมาะสมและได้มาตรฐานสำหรับอุตสาหกรรมอาหารทะเล. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2558. เข้าถึงได้จาก http://www.thaimex.net/index.php?lay=show&ac=article&Id=539009530

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2 ฉบับปรับปรุง). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, พร้อมจิตร ศรลัมพ์, วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, วิชิต เปานิล, สมภพ ประธานธุรารักษ์ และนพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2542). *สมุนไพร: ยาไทยที่ควรรู้*. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง.

วันดี กฤษณพันธ์. (2541). *สมุนไพรน่ารู้* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ; สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. แหล่งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนสู่อาหาร. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, 2539, หน้า 4-7.

วิสิฐ จะวะสิต. (2553). การปรับปรุงข้อกำหนดเกี่ยวกับมาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้ เกิดโรค ในประกาศกระทรวงสาธารณสุขตามพระราชบัญญัติอาหารพุทธศักราช 2522. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2558. เข้าถึงได้จาก http://stang.sc.mahidol.ac.th/newbooks/?p=6294

ศรีวรรณา หัทยานานนท์, (2554). ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค : *Vibrio parahaemolyticus*. ศูนย์ข้อมูลติดเชื้อและพาหะนำโรค. เข้าถึงได้จาก http://webdb.dmscmoph.go.th/

ศรีสมร คงพันธุ์ และมณี สุวรรณผ่อง. (2533). *อาหารทะเล*. กรุงเทพฯ: แสงแดด.

ศูนย์เครือข่ายอาหารครบวงจร. (2015). อาหารทะเลแห้ง. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2558. เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4277/%E0%B8%AD%E0%B8%B2%E0%B8%AB%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%97%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A5%E0%B9%81%E0%B8%AB%E0%B9%89%E0%B8%87-dried-seafood

สมภพ ประธานธุรารักษ์ และพร้อมจิต ศรลัมพ์. (2552). *สมุนไพร : การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สามลดา.

สินหทัย สมบูรณ์ยิ่ง. (2545). *การสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี*. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุชาดา ไชยสวัสดิ์ และสุรชัย แก้วบุญเรือง. (2551). วันที่ค้นข้อมูล 6 มีนาคม 2554, เข้าถึงได้จาก http://www.olympic4.ob.tc/home2.html

สุชาดา ไชยสวัสดิ์, ดาราวรรณ ทองบุตร, วราภรณ์ เมธาวิริยะศิลป์, อริยะ ไชยสวัสดิ์, ณัฐพล พิทักษ์วรรัตน์, คชพล จาตุรนต์รัศมี และอมรรัตน์ สุทธิพินิจธรรม. (2551). การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของสมุนไพรในครัวไทย. ใน นริศรา คำแก่น, *การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร* (หน้า 7). กรุงเทพฯ: ก็อปปี้บ๊อกซ์.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2551). *การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน : วงศ์วิบริโอนาซีอี*. กรุงเทพ ฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2552). *การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ปรียาพร ทองเนียม และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553ก). แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 38(4), 509-519.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรียาพร ทองเนียม. (2553ข). การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*, 2(1), 70-83.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสวามินี ธีระวุฒิ. (2553ค). การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรียาพร ทองเนียม. (2557). การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*. 2(1). 70-84.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. นนทบุรี: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สุวิมล กีรติพิบูล. (2546). *จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร*. กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).

สำนักงานป้องกันควบคุมโรค. (2551). *รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สคร. 6 ขอนแก่น*. กลุ่มระบาดวิทยา สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2556). มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. วันที่ค้นข้อมูล 15 มกราคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.acfs.go.th/standard/showSTD.php?pageid=6&STDname1=

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลย. (2553). *ประมวลสารสมเทศพร้อมใช้ "แบคทีเรียในอาหาร"*. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR19.pdf)

อัจฉรา เพิ่ม. (2550). *แบคทีเรียแลคติก*. กรุงเทพฯ: ภาพพิมพ์.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2553). *แบคทีเรียทางการแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Adwan, G. and Mhanna, M. (2008). Synergistic effects of plant extracts and antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 3(3), 134-139.

Adwan, G., B. Abu-Shanab, K. Adwan and F. Abu Shanab, 2006. Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. Turk. *Journal of Biology*, 30: 239-242.

Ahmad, I. and Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 113–133.

Al-Bayati, F. A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 403-406.

Ayulo, A. M. R., Machado, R. A., and Scussel, V. M. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 171-178.

Beuchat L.R., Antimicrobial properties of spices and their essential oils. 1994, *in*: Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation (eds. Y.M. Dillon & R.G. Board). CAB International, Oxon, pp. 167–179.

Braga, L., Shupp, J., Cummings, C., Jett, M., Takahashi, J., Carmo, L., Chartone-Souza, E., and Nascimento, A. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 335–339.

Brul, S., and Coote, P. (1999). Preservative agents in food: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Microbiology*, 50, 1-17.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.

Chaisawadi, S., Thongbute, D., Methawiriyasilp, W., Pitakworarat, N., Chaisawadi, A., Jaturonrasamee, K. and Tanuthumchareon, W. (2003). Preliminary study of antimicrobial activities on medicinal herbs of Thai food ingredients. *Acta Horticulturae*, 675, 111-114.

Chambers, H. F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*, 10(4), 781-791.

Chotmongcol, K., Vuthiphandchai, V., Theeravut, S. and Nimrat, S. (2010) Contamination of formalin, salicylic acid and synthetic dyes of foods distributed in the Eastern Thailand. The 9th National Environmental Conference, March 24-27, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center.

Cichewicz, R. H. and Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine.*Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 61-70.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.

Cutler H.G. (1995) Natural product flavor compounds as potential antimicrobials, insecticides, and medicinals. Agro FOOD Industry Hi-Tech, 6, 19–23.

Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernandez, E., and Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57(2), 125-128.

Dupont, S., Canffin, N., Bhandari, B., Dykes, G. A. (2006). In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. *Food Control*, 17, 929-932.

Ewansiha, J. U., Garba, S. A., Mawak, J. D. and Oyewole, O. A. (2012). Antimicrobial Activity of *Cymbopogon citratus* (Lemon Grass) and It's Phytochemical Properties. *Frontiers in Science*, 2(6), 214-220.

Ganjewala, D., Gupta, A. K. and Muhury, R. (2012). An Update on Bioactive Potential of a Monoterpene Aldehyde Citral. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2(4), 186-199.

Gao, C., Tian, C., Lu, Y., Xu, J., Luo, J., and Guo, J. (2011). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seed against selected food-related bacteria. *Food Control*, 22, 517-522.

Gopinath, S. M., Suneetha, T. B. and Singh, S. (2013). Effect of *Cymbopogon citratus* terpenoids against bacterial pathogens causing bovine mastitis. *International Journal of Pharma & Bio Sciences* , 4(1), 247-253

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Michael, G. (2002). Food spoilage-interaction between food spoilage bacteria. *Food Microbiology*. 78, 79-97.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food microbiology*, 26(2), 142-150.

Hosseini, H., Cheraghali, A.M., Yalfani, R. and Razavilar, V. (2003). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast Iran. *Food Control*, 15, 187-190.

Huang, Y. R., Liu, K. J., Hsieh, H. S., Hsieh, C. H., Hwang, D. F., & Tsai, Y. H. (2010). Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan. *Food Control*, 21, 1234-1239.

Immanuel, G., Raj, P. I., Raj, P. E., and Palavesam, A. (2006). Intestinal bacterial diversity in live rock lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus) (Decapoda, Pleocyemata, Palinuridae) during transportation process. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 1(2), 69-73.

Jafari, B., Ebadi, A., Aghdam, B. M. and Hassanzade, Z. (2012). Antibacterial activitiesof lemon grass methanol extract and essence on pathogenic bacteria. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 12(8), 1042-1046.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Shakila, J. R., Maheswari, K., and Sukumar, D. (2004). Dry ice as a novel chilling medium along with water ice for short-term preservation of fish emperor breams, lethrinus (*Lethrinus miniatus*). *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 5(4), 485-493.

Kalaimani, N., Gopakumar, K., & Nair, T. S. U. (1988). Quality characteristics of cured fish of commerce. *Fishery Technology*, 25, 54-56.

Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Van Vuuren, S. F. and Van Zyl, R. L. (2006). *In vitro* evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*. *South African Journal of Botany*, 72(4), 634-636.

Karmegam, N., Jayakumar, M., and Karuppusamy, S. (2012). Synergistic antibacterial activity of four medicinal plants collected from Dharapuram Taluk of Tiruppur District, South India. *Journal of Plant Sciences*,7(1). 32-38.

Karmegam, N., Karuppusamy, S., Prakash, M., Jayakumar, M. and Rajasekar, K. (2008). Antibacterial potency and synergistic effect of certain plant extracts against food-borne diarrheagenic bacteria. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2, 88-93.

Kérouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. and De Buyser, M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International journal of food microbiology*, 115(3), 369-375.

Keskin, D., and Ekmekci, S. (2007). Investigation of the Incidence of *Pseudomonas* sp. in food. *Journal of Biological Chemistyr*, 35(3). 181-186.

Keskin, D., and Toroglu, S. (2011). Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *Journal of Environmental Biology*, 32, 251-256.

Kim, J., Marshall, M. R. and Wei, C. (1995). Antimicrobial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and* Food Chemistry, 43, 2839-2845.

Kiran, S. R., Devi, P. S. and Reddy, K. J. (2008). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of Chloroxylon swietenia. DC. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1909-1914.

Kuroda, M., Nagasaki, S., Ito, R. and Ohta, T. (2007). Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*, 273(1), 28-34.

Lalitha, K. V. and Surendren, P. K. (2006). Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice. *Food Control*, 17, 802-807.

Lin, Y. T., Labbe, R. G., and Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5672-5678.

Lin, Y. T., Labbe, R. G. and Shetty, K. (2005). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 6, 453-458.

Lopez, C. M., Nitisinprasert, S., Wanchaitanawong, P. and Poovarodom, N. (2003). Antimicrobial activity of medicinal plant extracts against foodborne spoilage and pathogenic microorganisms. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 37, 460 – 467.

Lucera, A., Costa, C., Conte, A. and Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-13.

Mabrouk, M. I. (2012). Synergistic and Antibacterial Activity of SIX Medicinal Plants Used In Folklore Medicine In Egypt Against E. coli O157: H7. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(2). 1321-1327.

Machado, T. B., Pinto, A. V., Pinto, M. C. F. R., Leal, I. C. R., Silva, M. G., Amaral, A. C. F., Kuster, R. M. and Netto-dosSantos, K. R. (2003). *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *S. aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, 279-284.

Martın, M. C., González-Hevia, M. A. and Mendoza, M. C. (2003). Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food microbiology*, 20(5), 605-610.

Munn, C. B. (2004). *Marine microbiology*. London: BIOS Scientific Publishers.

Nahrstedt, A. and Butterweck, V. (2010). Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's wort. *Journal of Natural Products*. 73, 1015–1021.

Nakatani, N., 1994. Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. In: Charalambous, G. (Ed.), Spices, Herbs and Edible Fungi. Elsevier Science, New York, pp. 251–271. (ed. G. Charalambous). Elsevier Science, New York, pp. 251-271.

Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. and Sayeed, S. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Sciences*, 72, 341–345.

Nguefack, J., Dongmo, J. B., Dakole, C. D., Leth, V., Vismer, H. F., Torp, J. and Nkengfack, A. E. (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International journal of food microbiology*, 131(2), 151-156.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiub, A., Decastellic, L., Mionid, R., Scuotae, S., Bolzonif, G., Di Giannataleg, E., Salinettih, A. P., La Salandra G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C. and Celano, G.V. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology,* 98, 73-79.

Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A. and Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 290-296.

Pavlovic, R., Mladenovic, J., Radovanovic, B., Acamovic-Đokovic, G., Zdravkovic, J. and Zdravkovic, M. (2012). Phenolic compounds and biological activity of *Capsicum annuum* L. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10446-10450.

Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. and Krieg, N. R. (1993). Microbiology Concepts and Application. New York. Mc Graw-Hill, Inc. New York.

Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N. and Nostro, A. L. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*, 18(3), 196-200.

Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., and Bennett, B. C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plant on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 418-428.

Reddy, M., Gupta, S., Jacob, M., Khan, S. and Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73, 461–467.

Samutsan, S., Vuthiphandchai, V., Theeravut, S. and Nimrat, S. (2010) Distribution of borax, sodium hydrosulfite and pesticide residues in food product from Eastern Thailand. The 9th National Environmental Conference, March 24-27, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center. (In Thai).

Sandel, M. K. and McKillip, J. L. (2004). Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, 15(1), 5-10.

Santos, M. M. P., Vieira-da-Motta, O., Vieira, I. J. C., Braz-Filho, R., Gonçalves, P. S., Maria, E. J. and Souza, C. L. M. (2012). Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus* mutans. *Journal of natural medicines*, 66(2), 354-356.

Saritha ,K., Immaculate, J. K., Velammal, A., & Jamila, P. (2012). Microbial and Biochemical Qualities of Salted and Sun Dried Sea Foods of Cuddalore, Southeast Coast of India. *International Journal of Microbiological Research*, 3(2), 138-143.

Setha, B., Laga, A. and Mahendradatta, M. (2014). Antibacterial activity of leaves extracts of *Jatropha curcas*, Linn against *Enterobacter aerogenes* *International Journal of Scientific & Technology Research*, 3(1), 1129-1131.

Sethi, S., Dutta, A., Lal Gupta, B. and Gupta, S. (2013). Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5(1). 260-262.

Shakila, R. J., Lakshmanan, R., & Jeyasekaran, G. (2002). Incidence of amine forming bacteria in the commercial fish samples of Turocorin region. *Indian Journal of Microbiology*, 42, 147-150.

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. and Corke, H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary species and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112–119.

Sharma, A., Gupta, S., Sarethy, I. P., Dang, S. and Gabrani, R. (2012). Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chemistry*, 135, 672-675.

Sikkema, J., Bont, J. A. M. D. and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201– 222.

Slaven, E. M., Lopez, F. A., Hart, S. M. and Sanders, C. V. (2001). Myonecrosis caused by *Edwardsiella tarda*: a case report and case series of extraintestinal *E. tarda* infections. *Clinical Infectious Diseases*, 32(10), 1430-1433

Sofowora, A. (1982). *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. Chichester: John Wiley.

Somolinos, M., Garcia, D., Condon, S., Markey, B. and Pagan, R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 6, 1928-1939.

Sultanbawa, Y. (2011). Plant antimicrobials in food applications: Minireview.*Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Mendez Vilas (Ed.)*, 1084-1093.

Surendraraj, A., and Nirmala. (2008). Incident of Enteric pathogens and coliforms in Fish from Domestic market of Cochin. *Fishery Technology*, 45, 79-89.

Tyagi, A. K. and Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food chemistry*, 126(1), 228-235.

Van der Mee-Marquet, N., Blanchard, M., Domelier, A. S. and Quentin, R. (2004). Virulence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various origins. *Pathologie Biologie*, 52(10), 579-583.

Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S. and Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 49–54.

Voravuthikunchai, S., Sririrak, T., Limsuwan, S., Supawita, T., Iida, T. and Honda, T. (2005) Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Health Sciences*, 51, 590–596.

Wang, I. K., Chen, Y. M., Lin, C. L., Chang, H. Y., Chuang F. R. and Lee, M. H. (2005). Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. *International Clinical Psychopharmacology*, 59(8), 917-921.

Weerakkody, N. S., Caffin N., Turner, M. S. and Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21, 1408-1414.

Wei, L. S., Musa, N., Wendy, W., Musa, N., Seng, C. T., Shazili, N. A. and Shaharom, F. (2012). Reviews on phenothypes of *Edwardsiellatarda* in fish.*Ministry of Science, Technology and Innovation, Malaysia and National Science Fellowship.*

Williamson, E.M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8, 401–409.

Witkowska, A. M., Hickey, D. K., Alonso-Gomez, M. and Wilkinson, M. (2013). Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research*, 2(4). 37-54.

Wittman, R. J. and Flick, G. J. (1995). Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. *Annual Review of Public Health*, 16, 123-140.

Zare, Z., Majd, A., Sattari, T. N., Iranbakhsh, A. and Mehrabian, S. (2012). Antimicrobial activity of leaf and flower extracts of *Lippia nodiflora* L. (Verbenacea). *Journal of Plant Protection Research*, 52(4), 401-403.

Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L. and Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81, 686–692.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ พรพิมล สุดแสวง แสงสุริยา สุขพัฒน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2558) ผลของสารสกัดพริกชี้ฟ้าต่อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) T18 ในหมึกแปรรูป. การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 7. มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 30-31 มีนาคม 2558.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ พรพิมล สุดแสวง และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2558) ผลของสารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูป. การประชุมวิชาการ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 11. มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 22-23 กรกฎาคม พ.ศ. 2558.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาเอก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คือ นางสาวพรพิมล สุดแสวง ซึ่งเป็นนิสิตที่ได้รับทุนของโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่กำลังศึกษาอยู่ในปัจจุบัน

รายงานสรุปการเงิน
เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802280 สัญญาเลขที่ 65/2558
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาศักยภาพพืชสมุนไพรไทยเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสู่มาตรฐานสากล
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 **ถึงวันที่** 30 กันยายน พ.ศ. 2558
ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	400,000 บาท	เมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2557
งวดที่ 2 (40%)	320,000 บาท	เมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม พ.ศ. 2558
งวดที่ 3 (10%)	80,000 บาท	เมื่อวันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2558

รวม 800,000 บาท (แปดแสนบาทถ้วน)

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้ (บาท)	งบประมาณที่ใช้จริง (บาท)	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน (บาท)
1. ค่าตอบแทน	165,000	165,000	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	315,000	315,000.67	เกิน 0.67
4. ค่าใช้สอย	240,000	240,200	เกิน 200
5. เงินทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยเป็นค่าสาธารณูปโภค ร้อยละ 10	80,000	80,000	-
รวม	**800,000**	**800,200.67**	**เกิน 200.67**

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน