รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2

เรื่อง

สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี

(Novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province)

โดย
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องสารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี (Novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province) สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ข้าพเจ้าและคณะทำงานขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ
มีนาคม 2558

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเรื่อง สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี โดยดำเนินการ 2 ขั้นตอน และขั้นตอนที่ 1 คือ ขั้นตอนการศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ภายใต้สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสมีความสามารถในการอยู่รอดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 10^6 CFU/g และ 10^5 CFU/g ภายใต้สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษาอาหารทะเลแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์ ต่อมาในขั้นตอนที่ 2 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปของส่วนใสเข้มข้นและสารกึ่งบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับกรดแลคติกและสารไนซิน เป็นระยะเวลา 28 วัน ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปของส่วนใสเข้มข้นมีความสามารถในการลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

คำสำคัญ : ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล; สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ; โพรไบโอติก; บาซิลลัส

Abstract

In this study, novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province were studied. There were two steps of experiment. In the first step, survival ability of the freeze dried probiotic bacteria and changing water activity in 3 types of dried squid products under 4 and 30 ^{o}C storage for 28 days were evaluated. Results reported that *Bacillus* probiotics were able to survive in three dried squid products for 10^{6} CFU/g and 10^{5} CFU/g stored at 4 and 30 ± 2 ^{o}C for 28 days, respectively. Furthermore, the storage condition at 4 ^{o}C of dried squid products was not effect to changing water activity in samples. In the next step, comparison of the efficiency of bioactive compounds from *Bacillus* probiotic bacteria in forms of concentrated supernatant and semi-purified one; and lactic acid as well as nisin for inhibitory of total heterotrophic bacteria were studied at 4 and 30 ^{o}C for 28 days of experiment. Results represented that bioactive compounds from *Bacillus* probiotic bacteria in form of concentrated supernatant showed the capability for inhibitory of total heterotrophic bacteria better that the other treatments significantly ($P<0.05$).

Keywords : Seafood product; Bioactive compounds; Probiotics; *Bacillus*

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญตาราง (ต่อ)

สารบัญภาพ

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันอาหารทะเลได้รับความนิยมมีผู้บริโภคมากขึ้นและยังเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง ผู้บริโภคมักนิยมรับประทานอาหารทะเลทั้งแบบดิบและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป อาหารทะเลดิบที่พร้อมบริโภค เช่น กุ้ง หอยนางรม เป็นต้น ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป เช่น กะปิ กุ้งแช่แข็ง กุ้งแห้งและปลาเค็ม เป็นต้น ตามนโยบายของรัฐบาลที่กำหนดให้ปี พ.ศ. 2547 เป็นปีแห่งการสร้างระบบความปลอดภัยด้านอาหารเพื่อให้ประชาชนมีสุขภาพดีถ้วนหน้าและเพื่อให้อาหารที่ผลิตและบริโภคในประเทศมีความปลอดภัยได้มาตรฐานนำไปสู่การเป็น "ครัวโลก" ปัจจุบันสาธารณสุขจังหวัดชลบุรีได้ทำการตรวจสอบคุณภาพทั้งด้านเคมีและด้านจุลินทรีย์ พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและสารเคมีสังเคราะห์เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) นอกจากนั้นจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงและสีสังเคราะห์ร้อยละ 0.00-39.02 และ 14.89-100.00 ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงมากที่สุดคือ หมึกแห้งและหมึกแปรรูป (ร้อยละ 39.02) และผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของสีสังเคราะห์สูงที่สุดคือ ปูกรอบ (ร้อยละ 100) รวมทั้งปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปมีค่าอยู่ระหว่าง $1.00 \pm 0.50 \times 10^{2} - 5.23 \pm 0.63 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียที่พบมากกว่าร้อยละ 50 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีพบในช่วง $0.00 - 1.04 \pm 0.04 \times 10^{5}$ CFU/g โดยแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *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* และแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือมีปริมาณอยู่ในช่วง $1.00 \pm 0.00 \times 10^{2}$ - $3.12 \pm 0.18 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Pantoea* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ก, 2553ข; 2553ค; Chotmongcol et al. 2010; Samutsan et al., 2010)

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารและการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคยังเป็นปัญหาสำคัญอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Fisher and Phillips, 2006) จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขชี้ให้เห็นถึงอันตรายจากการเจ็บป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค สะท้อนจากตัวเลขของผู้ป่วยตลอด 15 ปีที่ผ่านมา โดยในปี พ.ศ. 2548 สำนักระบาดวิทยาได้รายงานว่า พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยรวมทั้งสิ้น 140,949 ราย คิดเป็นอัตราการป่วย 226.62 รายต่อประชากรแสนคน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2539 ที่มีอัตราการป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ

เท่ากับ 136.87 รายต่อประชากรแสนคน (สำนักระบาดวิทยา, 2548) ซึ่งปัญหานี้กำลังเพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ในปี พ.ศ. 2552 พบว่ามีผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษมากกว่า 1.5 แสนรายต่อปี (ข้อมูลสถิติประจำปี พ.ศ. 2552 จากกระทรวงสาธารณสุข เรื่องผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ) จากรายงานการศึกษาข้อมูลของฝ่ายพัฒนา ระบบข้อมูลเฝ้าระวังโรค สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคพบว่า แบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษของคนไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบบ้าง ได้แก่ *Clostridium butulinum*, *Clostridium perfringens* (สำนักระบาดวิทยา, 2545; 2548) จากปัญหาที่เพิ่มขึ้นนี้ทำให้มีการกำหนดมาตรฐานที่มุ่งเน้นการลดการปนเปื้อนโดยการออกกฎหมายและส่งเสริมแนวความคิดในการบริโภคอาหารที่ปราศจากสารกันเสีย มีความปลอดภัยและมีขั้นตอนการผลิตอาหารที่ถูกสุขอนามัย (Brul and Coote, 1999) ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมมาตรฐานของอาหารจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์คือ การยับยั้งการเจริญหรือการทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารด้วยการปรับสภาวะไม่ให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ การใช้สารเคมีหรือสารต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในปัจจุบันสารเคมีสังเคราะห์หลากหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดแล็คติก (Lactic acid) กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) กรดซอร์บิก (Sorbic acid) ไนไทรต์ (Nitrite) และซัลไฟท์ (Sulfites) เป็นต้น (Beuchat and Golden, 1989; Davidson, 1997; Sofos et al., 1998)

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยและต้องการอาหารที่ไม่เจือปนสารเคมี จึงส่งผลให้บริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ หันมาสนใจเทคนิคที่ใช้สารที่ได้จากธรรมชาติหรือสารที่ไม่มีความเป็นพิษในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นทางเลือกจากธรรมชาติจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการควบคุมหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย จากการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้โดยการเติมแบคทีเรีย (Addition of live bacteria; Ananou et al., 2007) ยกตัวอย่างเช่น Matamoros et al. (2009a) รายงานว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเดี่ยว คือ *Lactobacillus piscium* สายพันธุ์ EU2241 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* และยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เย็นบรรจุแบบสุญญากาศ (Chillled vacuum-packaged shrimp) นอกจากนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียผสมยังเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเช่นเดียวกัน เช่น การใช้แบคทีเรียผสมของ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus* และ *Staphylococcus xylosus* สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมถึงแบคทีเรียที่ผลิตสารก่อภูมิแพ้ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มผลิตฮีสตามีน (Histaminogenic bacteria) และสารไบโอจีนิกเอมีนอื่น ๆ (Biogenic amines) ได้แก่ Tyramine, Cadaverine, Putrescine และ Tryptamine (Emborg and Dalgaard, 2006; Yongjin et al., 2007) และการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียในรูปของสารบริสุทธิ์ เช่น การใช้ไนซินและ

เพดิโอซินสามารถลดปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count) ในปลาสดหั่นชิ้น (Fresh fish fillets) และควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นปลา (Yin et al., 2007) รวมทั้งการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ เช่น Mesenterocin Y ที่ผลิตจาก *Lactobacillus sakei* สามารถลดปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci, Coagulase-negative cocci และยีสต์ รวมทั้งไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก (Zdolec et al., 2008)

ในปัจจุบันมีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ ไนซิน มาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากสารกลุ่มแบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและเป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547; Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดประการหนึ่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดนี้ คือ ไนซินมีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง (ประมาณ 1,990 บาทต่อกิโลกรัม) ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตอาหารแปรรูปเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นทีมงานวิจัยของเราจึงมีความมุ่งมั่นในการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้จากประเทศไทยซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์และมีราคาที่ถูกเพื่อทดแทนไนซินและสารเคมีสังเคราะห์ชนิดอื่นที่ใช้ในปัจจุบัน โดยได้เริ่มการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 และได้ค้นพบองค์ความรู้ในการจัดจำแนกและพัฒนาแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้ง ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทางอาหารมากที่สุดชนิดหนึ่ง 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

โครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงการพัฒนาสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในปัจจุบัน เพื่อมุ่งยกระดับมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีด้วยการศึกษาถึงสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อส่งจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ และเพื่อให้มหาวิทยาลัยบูรพาซึ่งเป็นมหาวิทยาลัยในภาคตะวันออกสามารถช่วยเหลือทางด้านวิชาการให้แก่ชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเพื่อทำให้การศึกษาในเรื่องดังกล่าวได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้จากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ต่อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปเพิ่มเติมจาก *S. aureus* และทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและ

แปรรูป โดยประเมินถึงประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยยังได้วางแผนระเบียบการวิจัยในการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยวัสดุที่มีราคาถูกเพื่อมุ่งพัฒนาในการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากในปัจจุบันการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (ไนซิน) ที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปนั้นมีราคาค่อนข้างสูงอันเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ใช้ในกระบวนการผลิตมีราคาสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งของสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิต แต่ทั้งนี้ยังคงต้องคำนึงถึงปริมาณของสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกว่ามีครบถ้วนหรือไม่ และองค์ประกอบในอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเชื้อและการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป รวมทั้งจะต้องมีปริมาณมากพอ มีคุณสมบัติคงที่ จัดหาได้ง่ายและสามารถจัดการของเสียหรือน้ำเสียที่เกิดขึ้นได้โดยง่าย (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534) แหล่งของสารอาหารที่เหมาะสมและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งยังอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี ยกตัวอย่างเช่น กากน้ำตาล (Molasses) (ไวรุจน์ เดชมหิทกุล และคณะ, 2550; Khodair et al., 2008) น้ำแช่ข้าวโพด (Corn-steep liquor) (Amarty and Leung, 2000) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) (El Enshasy et al., 2008) และหางนม (Whey) (Rech and Ayub, 2007) เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการยกระดับมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีด้วยการศึกษาถึงสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์แล้ว ยังมุ่งในการเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาการกำจัดของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรอีกด้วย ซึ่งจะส่งผลให้ประเทศไทยมีความมั่นคงทางอาหารและมีศักยภาพในการแข่งขันทางด้านอุตสาหกรรมอาหารกับนานาประเทศได้อย่างเข้มแข็งและยั่งยืน อันเนื่องมาจากการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่สรรสร้างโดยคนไทยและเหมาะสมต่อประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาหาระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นานที่สุดและยังคงรักษาระดับมาตรฐานทั้งในประเทศและต่างประเทศ

2.2 เพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและทำลายแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์และพัฒนาให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงระดับเชิงพาณิชย์

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาในปีที่ 2 จะเป็นการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป เพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

สามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์เพื่อควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรีย รวมทั้งลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากสารเคมีสังเคราะห์ ทำให้คุณภาพชีวิตของประชากรไทยในท้องถิ่นและประเทศชาติดีขึ้นเทียบกับมาตรฐานโลกและทำให้ผู้ส่งออกต่างประเทศมีความมั่นใจและยอมรับในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปซึ่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

1. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร
2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
3. โพรไบโอติก
4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

ความปลอดภัยของอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งอาหารทะเลเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ในแต่ละปีประเทศไทยผลิตและส่งออกสินค้าประเภทนี้จำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เหล่านี้ยังคงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ อันส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดโรคจากการบริโภคอาหารทะเล แบคทีเรียก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ยกตัวอย่างเช่น

Bacillus cereus จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนตรง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (Endospore) บริเวณกลางเซลล์ เซลล์ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนระดับอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ คือ 72 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้จึงมักพบสปอร์เจริญอยู่ในอาหาร มักพบเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในดิน น้ำ ฝุ่นละออง ในอาหารสุก อาหารดิบและธัญพืช *B. cereus* สามารถผลิตสารพิษออกมาอย่างน้อย 2 ชนิด และแต่ละชนิดจะทำให้เกิดอาการของโรคต่างกัน สารพิษจะสร้างออกมาในระหว่างการเจริญและยังคงอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์แตกสารพิษจึงถูกปล่อยออกมา อาการของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *B. cereus* มี 2 แบบ คือ 1) อาการท้องร่วง (Diarrheal form) เกิดจากสารพิษที่เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน (Thermolabile) ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ แต่ไม่อาเจียน ไม่มีไข้ ผู้ป่วยจะหายเองได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *C. perfringens* 2) อาการอาเจียน (Emetic form) เกิดจากสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งที่ทนความร้อนได้ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย โดยอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

Clostridium perfringens จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์รูปไข่ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญในที่ที่ไม่มีอากาศ เซลล์ปกติจะถูกทำลายได้โดยใช้ความร้อนต่ำแต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อนี้ได้ พบเซลล์ปกติและสปอร์ได้ทั่วไปในดิน น้ำ อาหาร เครื่องเทศ ฝุ่นละออง ลำไส้มนุษย์และสัตว์ น้ำโสโครกและสิ่งปฏิกูล เป็นต้น *C. perfringens* สามารถสร้างสารพิษได้ 5 ชนิด คือ A, B, C, D และ E แต่สารพิษชนิด A มักเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษและสร้างก๊าซ อาการของโรคจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภค

อาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณมาก แบคทีเรียชนิดนี้ทนต่อความเป็นกรดของกระเพาะอาหารจึงมีชีวิตรอดผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็ก เจริญและสร้างสปอร์พร้อมๆ กับขับสารพิษออกมามาก ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) อาการของโรคคือ ท้องเสีย ปวดท้อง เนื่องจากมีแก๊สในกระเพาะอาหารมาก คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อัตราการตายต่ำ ถ้ามีการตายจะพบในเด็กทารก คนชราและคนป่วยด้วยโรคอื่นที่มีร่างกายอ่อนแอ อาการต่าง ๆ จะหายเองภายใน 24 ชั่วโมง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) *C. perfringens* มักพบในอาหารแห้งทั่ว ๆ ไป แต่จะไม่พบในอาหารแช่แข็งเพราะสปอร์ไม่สามารถทนอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำ ผลิตภัณฑ์ประมงที่พบเชื้อนี้ เช่น กะปิ ปลาเค็ม ปลาร้า ปลาเจ่าและกุ้งแห้ง (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบได้ทั่วไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์และสัตว์ เช่น จมูก มือ ผิวหนัง รวมทั้งอากาศและฝุ่นละออง การปนเปื้อนของเชื้อนี้ในอาหารมาจากการไอ จามลงในอาหารหรือจากผิวหนัง เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนลงในอาหารและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจะสร้างสารพิษ (Enterotoxin) ภายในเซลล์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหาร ชนิดของสารพิษที่สร้างมี 5 ชนิด คือ A, B, C, D และ E ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนความร้อน (Heat stable toxin) สารพิษชนิดนี้ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ผู้บริโภคจึงไม่สามารถทราบได้ว่ามีสารพิษเกิดขึ้นในอาหาร เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง จะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย เหงื่อแตก ปวดศีรษะ อ่อนเพลียและบางครั้งมีไข้ด้วย อาการป่วยจะดีขึ้นภายใน 8-24 ชั่วโมง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

***Salmonella* sp.** จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ไม่ทนความร้อนสามารถทำลายได้ในระยะเวลาอันสั้น พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า สัตว์ปีก เต่า กบ รวมทั้งแมลงต่าง ๆ สามารถแยกเชื้อได้จากดิน น้ำและสิ่งโสโครกต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระ อาการของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *Salmonella* sp. ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาวสั่นและอุจจาระร่วง อ่อนเพลีย มีไข้ปานกลาง โดยสามารถจำแนกอาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* sp. ได้ 3 แบบคือ 1) โรคไข้เอนเทอริค (Enteric fever) ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ คือ *S. typhi* และเชื้อที่เป็นสาเหตุของพาราไทฟอยด์ คือ *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B และ *S. paratyphi* C โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์เกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น โดยได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่ม แสดงอาการภายใน 12-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ปอดอักเสบ เบื่ออาหาร ท้องอืด ม้ามโต อาจมีอาการอุจจาระร่วง ระยะของโรคประมาณ 3-4 สัปดาห์ 2) โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีไข้สูง ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม อาจมีอาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ 3) กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) ส่วนใหญ่เชื้อนี้มักจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ภายใน 8-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง มีไข้เล็กน้อย อาจพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* sp. ในเนื้อสัตว์ เช่น ไก่ หมู ปลาและสัตว์มีเปลือก ในผลิตภัณฑ์ประมงประเภทสัตว์

มีเปลือกแช่แข็งพร้อมบริโภค (Precooked frozen crustaceans) ในระหว่างกระบวนการผลิต เพราะอาหารประเภทนี้จะสัมผัสกับคนงานโดยตรง ถ้าคนงานไม่ระมัดระวังเรื่องความสะอาด เชื้อจากคนงานจะปนเปื้อนเข้าไปในอาหาร เมื่อนำอาหารไปแช่แข็งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทนอยู่ได้ ดังนั้นเมื่อนำอาหารมาละลายแล้วนำไปรับประทานทันทีก็จะทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อเข้าไปด้วย (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

Vibrio parahaemolyticus จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลืออยู่ 3% พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อย สามารถทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อาการของโรคเกิดขึ้นภายหลังได้รับเชื้อ 10-24 ชั่วโมง โดยจะมีอาการปวดท้องอย่างรุนแรงภายใน 2-48 ชั่วโมง มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียนและอุจจาระร่วง ถ้าพิษรุนแรงจะทำให้ถ่ายออกมามีมูกเลือด (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538) สามารถแยกเชื้อได้จากอาหารทะเลต่าง ๆ ในระหว่างฤดูร้อน การระบาดของโรคเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวซึ่งเกิดจากผู้ป่วยรับประทานอาหารทะเลดิบ อาหารทะเลที่ปรุงไม่สุกหรือมีเชื้อปนเปื้อนภายหลังการปรุงอาหารสุกแล้ว ได้แก่ ปลา ปู เป็นต้น (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

นอกจากนั้นยังพบงานวิจัยหลายชนิดที่ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่

Hatha and Lakshmanaperumalsamy (1997) รายงานการตรวจพบ *Salmonella* ในปลาและสัตว์มีเปลือก จำนวน 370 และ 276 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยซื้อตัวอย่างจากตลาดในเมือง Coimbatore ทางตอนใต้ของประเทศอินเดียตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 1990 ถึงเดือนสิงหาคม ปี ค.ศ. 1992 ตรวจพบ *Salmonella* ในปลาและสัตว์มีเปลือกจำนวน 14.25% และ 17.39% ตามลำดับ สามารถจำแนก Serotype ได้ คือ *Salmonella weltevreden, S. typhi, S. paratyphi* B, *S. mgulani* และ *S. typhimurium* ซึ่งพบได้ทั้งในปลาและสัตว์มีเปลือก ส่วน *S. senftenberg* พบได้ในสัตว์มีเปลือกเท่านั้น

Hosseini et al. (2004) รายงานการตรวจพบ *Vibrio* spp. ในกุ้งที่จับได้จากชายฝั่ง Persian Gulf อยู่ทางตอนใต้ของประเทศอิหร่าน มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 770 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Vibrio* spp. ในตัวอย่าง 16 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. damsela* และ *V. fluvialis* แต่จากการทดลองนี้ตรวจไม่พบ *V. cholerae*

Aycicek et al. (2005) รายงานการตรวจพบ *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภคจากร้านขายอาหารในกองทัพบกที่เมือง Ankara ประเทศตุรกี จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 512 ตัวอย่าง ได้แก่ ตับ สลัดผัก สลัดรัสเซีย พิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ Meatballs, Turkish lahmacun, Turkish pide และ Turkish doner ตรวจพบ *S. aureus* ที่ให้ผลการทดสอบโคแอ็กกูเลสเป็นบวก ในตัวอย่าง 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.4% มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 2.2 - 4.3 log CFU/g ชนิดของอาหารพร้อมบริโภคได้แก่ สลัดผัก สลัดรัสเซีย และ Meatballs มี *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารมากกว่าพิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ Turkish lahmacun, Turkish pide และ Turkish doner จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* อาจปนเปื้อนในอาหารได้จากการใช้มือสัมผัสกับอาหาร

Colakoglu et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในหอยและกุ้งที่ซื้อจากตลาดและห้องครัวของโรงแรมในเมือง Dardanelles ประเทศตุรกี จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 127 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอย 97 ตัวอย่าง และกุ้ง 30 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในตัวอย่าง 84 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *Vibrio alginolyticus* จำนวน 26.7%, *V. vulnificus* จำนวน 9.7%, *V. parahaemolyticus* จำนวน 0.8% และ *A. hydrophila* จำนวน 29.1%

Normanno et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Salmonella* spp., *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) ในหอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) จำนวน 600 ตัวอย่าง ซึ่งจำหน่ายที่ตลาดในเมือง Puglia ประเทศอิตาลี ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างจำนวน 47 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็น 7.83% และ 2.83% ตามลำดับ พบ *E. coli* ในตัวอย่างจำนวน 21 ตัวอย่าง คิดเป็น 3.5% แบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์มในตัวอย่างจำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.66% และ *Salmonella* ในตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.16%

Parihar et al. (2008) รายงานการตรวจพบ *Listeria* spp. ในอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาดในเมือง Goa ประเทศอินเดีย จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 115 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Listeria* spp. ในตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้คือ *L. monocytogenes* พบใน 10 ตัวอย่าง และ *L. innocua* พบใน 18 ตัวอย่าง โดย *L. monocytogenes* อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าปนเปื้อนในอาหารทะเลดิบแบบพร้อมบริโภค

2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

ตามปกติแล้วการเน่าเสียของอาหารจะทำให้ลักษณะทางด้านเคมีและทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณลักษณะของอาหาร เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รสชาติ สีและคุณค่าทางอาหาร ซึ่งการเน่าเสียของอาหารนี้สาเหตุหลักเกิดจากแบคทีเรีย (รังสินี โสธรวิทย์, 2550) โดยอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเป็นอาหารที่นอกจากจะพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารแล้วยังพบแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งไม่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้อาหารเน่าเสีย เกิดกลิ่น รสชาติและลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ไม่พึงประสงค์ ส่งผลให้ไม่สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารไว้บริโภคในระยะเวลานานได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ยกตัวอย่างเช่น *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Moraxella* และ *Pseudomonas* นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 1-3 องศาเซลเซียส จะพบแบคทีเรียกลุ่มชอบความเย็นอีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อเน่าเสีย ได้แก่ *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium* และ *Pseudomonas* เป็นต้น ซึ่งจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ชอบและทนอุณหภูมิต่ำได้เป็นอย่างดี จึงสามารถเจริญได้ในอาหารที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิระดับตู้เย็นและก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารติดตามมา แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งคือ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารหลากหลายชนิดเน่าเสีย ได้แก่ นม ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก ผลไม้ ขนมหวาน เครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมักดอง แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดเมือก กลิ่น

และรสชาติที่ผิดแผกไปของผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้ลักษณะการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลคติก สภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร ตลอดจนคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์และการบรรจุหีบห่อ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) นอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่สำคัญที่สามารถทำให้อาหารเสียได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่มผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ แบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ที่มักพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *Shewanella putrefaciens* หรือ *Pseudomonas putrefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนและเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Non-fermentative bacilli คือ กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Khashe and Janda, 1998) อยู่ในวงศ์ Shewanellaceae เป็นแบคทีเรียทางทะเลที่สามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (Holt et al., 2005)

งานวิจัยหลายฉบับได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ดังนี้

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และคณะ (2532) ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีของกุ้งแห้งที่จำหน่ายทั่วไป พบว่ากุ้งแห้งมีจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนค่อนข้างสูง มีกลิ่นแอมโมเนียและมีปริมาณรงควัตถุแอสตาแซนทีนต่ำ กุ้งแห้งส่วนใหญ่มีความชื้นค่อนข้างสูงถึง 30% – 50% มีกลิ่นแอมโมเนียจึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูง มีค่าประมาณ 8.0 – 8.4 มีค่าปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ในช่วง 0.72 – 0.78 และมีปริมาณเกลือสูงถึง 9% – 13% และจากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *S. aureus* และเชื้อรามีค่าเท่ากับ 5.00×10^{5}, 1.00×10^{2} และ 5.00×10 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 เชื้อรา *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

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ก) ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี จำนวน 21 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา (คิดเป็น 100%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มมากที่สุดคือ หมึกกะตอย มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.97\pm0.16\times10^{9}$ CFU/g และพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี จำนวน 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* ดังนั้นควรมีการติดตามตรวจสอบและ

ตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหารเป็นระยะ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่บริโภคในแต่ละวันและผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออก

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ข) ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในอาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าอาหารทะเลแห้งมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $6.00\pm2.00\times10^{2}$ 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 เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่วางจำหน่างในจังหวัดชลบุรีมีคุณภาพทางจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น

Ayulo et al. (1994) ทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปลาและความปลอดภัยของอาหารทะเลที่จับได้จากบริเวณชายฝั่งของรัฐซานตา คาทารินา และจำหน่ายในเมืองฟลอเรียโน-โปลิส 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 ตัวอย่าง ตรวจพบ *S. aureus* จำนวน 35 ตัวอย่าง คิดเป็น 20% และจากตัวอย่างเนื้อหอยคิดเป็น 60% และพบว่า *S. aureus* จำนวน 109 สายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวน 9 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ได้แก่ เอนเทอโรทอกซินเอ จำนวน 4 สายพันธุ์ เอนเทอโรทอกซินดี จำนวน 1 สายพันธุ์ และเอนเทอโรทอกซินเอบี จำนวน 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 แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดและแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญและรีดิวซ์ซัลไฟท์ไม่แสดงแนวโน้มที่สอดคล้องกัน

3. โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้มากขึ้นและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ จุลินทรีย์โพรไบโอติก ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium* sp. มีการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาผลิตอาหารหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดอง และเนื้อหมัก และมีการผลิตในรูป

ของแคปซูลและเมล็ดออกมาจำหน่ายตามท้องตลาด นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในอาหารสัตว์เร่งการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดโรค (อุษามาส จริยวรานุกุล, 2548)

ซึ่งโพรไบโอติก แปลว่า For life คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่คัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีอยู่แล้วในลำไส้ของมนุษย์ที่แข็งแรงดี โดยจะให้เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ เพื่อไปสู่ระบบทางเดินอาหาร และเข้าไปเจริญอยู่ในลำไส้ ทำหน้าที่เหมือนเป็นสมาชิกของจุลินทรีย์ในลำไส้ และก่อให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ อันจะเป็นผลดีต่อร่างกายหลายประการ โดยส่วนใหญ่มักจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacilli หรือ Bifidobacteria ในปัจจุบันมีหลักฐานการศึกษาในมนุษย์หรือสัตว์ทดลองพบว่า โพรไบโอติกมีบทบาทก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายหลายประการ (พีร์ เหมะรัชตะ, 2551)

การเจริญของโพรไบโอติกจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้นั้น เป็นไปตามกระบวนการธรรมชาติของจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากกว่าจะสามารถแย่งชิงอาหารได้ดีกว่า อีกทั้งยังปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีมากกว่านั้น ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถอยู่รอดได้ และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียจำพวกนี้ในระหว่างการเจริญจะทำให้ระดับความเป็นกรดด่างในสภาพแวดล้อมรอบ ๆ นั้นลดลง เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้ออื่น ๆ รวมทั้งเชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้พบว่าโพรไบโอติกบางชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะ (Adhesion) ของเชื้อก่อโรคกับผนังเซลล์ภายในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ และบางชนิดยังสามารถช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิต้านทานชนิด Immunoglobulin A ซึ่งจะช่วยกำจัดเชื้อโรคได้ โพรไบโอติกใช้ได้ดีในการควบคุมโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ช่วยป้องกันโรคอุจจาระร่วง ซึ่งเกิดจากการที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนไปกับอาหาร เมื่อเข้าสู่ระบบการย่อยอาหารจะเกิดการแบ่งตัวอย่างมาก ทำให้เกิดสภาวะผิดปกติในทางเดินอาหาร เป็นเหตุให้เกิดอาการอุจจาระร่วงได้ ดังนั้นการที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกอยู่ในทางเดินอาหารในปริมาณเพียงพอ จะทำให้สภาวะไม่เหมาะสมกับการแบ่งตัวของเชื้อโรค เป็นเหตุให้เชื้อโรคไม่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคนั้น ๆ ได้ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2547)

โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นทารก ซึ่งมีมากมายหลายชนิด ดังแสดงในตางรางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

Lactobacillus species	*Bifidobacterium* species	อื่น ๆ
L. acidophilus	*B. bifidum*	*Bacillus cereus*
L. casei (rhamnosus) - LGG	*B. longum*	*Escherichia coli*
L. reuteri	*B. breve*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. bulgaricus	*B. infantis*	*Saccharomyces boulardii*
L. plantarum	*B. lactis*	*Enterococcus faecalis*
L. johnsonii	*B. adolescentis*	*Streptococcus thermophilus*
L. lactis	-	-

บทบาทของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น กลุ่ม Lactobacilli จะสร้างน้ำย่อยเบต้า-กาแลกโตซิเดส ช่วยลดปริมาณน้ำตาลแล็คโตสในอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของอุจจาระร่วงได้ นอกจากนี้สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ช่วยกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร น้ำย่อยบางชนิดจากโพรไบโอติกจะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่พิษเข้าเซลล์และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียเข้าเกาะได้ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ไว้ต่อสู้กับเชื้อโรค และกระตุ้นการสร้างสารป้องกันโรคในร่างกาย เช่น Gamma-interferon, Interleukin-12 และ Interleukin-18 เป็นต้น (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) เป็นสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์และพืช สารอออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจงและสารนั้นจะต้องไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก แต่ถ้าหากสารใดก็ตามเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วมีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เราจะจัดสารนั้นเป็นพวกสารพิษ (Toxic substances) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้มุ่งศึกษาและพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารต้านจุลชีพหรือสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์ เภสัชวิทยาและอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันกำลังประสบกับปัญหาการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องมาจากมีการนำสารต้านจุลชีพมาใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการใช้ไม่ถูกวิธีส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการพัฒนาตนเองให้ทนต่อสารต้านจุลชีพ ทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นหรือสารต้านจุลชีพตัวเดิมใช้ไม่ได้ผล อีกทั้งในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการแพ้สารต้านจุลชีพ นอกจากนั้นการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้สร้างความกังวลเกี่ยวกับผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการรณรงค์และส่งเสริมการบริโภคอาหารที่มีความปลอดภัยและไม่เจือปนสารเคมีสังเคราะห์

ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามคิดค้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่เหมือนหรือให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานใกล้เคียงกันกับการสารต้านจุลชีพหรือสารเคมีสังเคราะห์ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน รวมทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Brink et al., 1994) สารชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างมากในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดนี้

ถือว่าเป็นสารป้องกันการเน่าเสียตามธรรมชาติ โดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) มนุษย์ได้นำสารชนิดนี้มาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อช่วยควบคุมคุณภาพอาหารและการป้องกันระบาดวิทยาของอาหารเป็นพิษที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร (Papagianni et al., 2006) แบคเทอริโอซินชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารและได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย คือ ไนซิน ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ในปัจจุบันไนซินได้ถูกนำมาใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายเชิงพาณิชย์ในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก ซึ่งช่วยแก้ปัญหาของการห้ามใช้สารต้านจุลชีพในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้เป็นอย่างดี (Li and O'Sullivan, 2002) ในประเทศสหรัฐอเมริกาไนซินได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยสามารถใช้ได้ในไข่เหลว ไส้กรอกและน้ำสลัด ในประเทศออสเตรเลียก็อนุญาตให้ใช้ไนซินได้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบที่มีองค์ประกอบของความชื้นสูงเพื่อป้องกันการเจริญของ *B. cereus* และยังมีรายงานอื่น ๆ อีกมากมายที่ได้ระบุว่า สามารถใช้ไนซินในการควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *Clostridium* spp. ได้ในผลิตภัณฑ์นมและสัตว์ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลกเพื่อช่วยรักษาคุณสมบัติของอาหารและยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมใช้ไนซิน เช่น เนยแข็งต่าง ๆ นมพาสเจอร์ไรซ์ นมสเตอริไรซ์ อาหารกระป๋อง เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เป็นต้น โดยปริมาณที่อนุญาตให้ใช้จะแตกต่างกันไปตามกฎหมายอาหารของแต่ละประเทศ ตัวอย่างเช่น ในประเทศไทยมีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 ไนซินในความเข้มข้นไม่เกิน 4,000 IU ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์อาหาร และอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งแปรรูป ส่วนคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญของอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ องค์การอนามัยโลกที่เกี่ยวกับสารเจือปนในอาหาร (Joint FAO/WHO Expert Committees on Food Additives) ได้มีการประเมินความเป็นพิษของสารนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1969 และได้กำหนดค่า Acceptable Daily Intake เป็น 0-33,000 หน่วยต่อกิโลกรัมของน้ำร่างกาย (ศิวาพร ศิวเวชช, 2546)

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการควบคุมและทำลายแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารและยืดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังรายงานการวิจัยต่อไปนี้

กรรณิการ์ เสนทอง และคณะ (2551) ได้คัดเลือกและแยก *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Lactobacillus* จากน้ำนมดิบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยก *Bacillus* และ *Lactobacillus* ด้วยวิธีกระจาย ได้เชื้อจำนวน 41 และ 40 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) ที่มีส่วนประกอบของนมซึ่งสกัดเอาไขมันออกความเข้มข้น 2% และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท BA26 และ BA27 สามารถ

ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 12.278 และ 12.058 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยสารตั้งต้นเคซีนความเข้มข้น 1.5% และเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเคซีนมากกว่าเจลลาติน ผลจากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบหลั่งออกนอกเซลล์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดัชนีด้วยวิธี Agar well diffusion ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมดจำนวน 81 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท คือ BA08, BA16, LA09, LA10, LA13, LA16, LA18, LA19 และ LA20 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 517 และ *Escherichia coli* TISTR 887 โดยมีวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร ซึ่งเมื่อจำแนกสายพันธุ์ โดยสังเกตลักษณะการติดสีย้อม สมบัติทางชีวเคมีและการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดคือ BA26 และ BA27 เป็น *Brevibacillus* Non reactive และจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 และ *E. coli* TISTR 887 โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งได้สูงสุดคือ BA08 เป็น *Brevibacillus laterosporus* และ BA16 เป็น *Geobacillus thermoglucosidasius* ส่วน *Lactobacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดัชนีทั้ง 2 ชนิด โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งสูงสุด คือ LA10 และ LA16 เป็น *Lactobacillus plantarum* 1 และ *Lactobacillus plantarum* 2 ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำเชื้อ *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์และอุตสาหกรรมเภสัชต่อไป

Anthony et al. (2009) ได้ศึกษาสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งการศึกษานี้ได้รับความสนใจมากขึ้นในการที่จะนำมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค การถนอมอาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียและการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียคือ *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากดินตะกอนจากน้ำทิ้งในโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด การผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. licheniformis* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Lactose, NH_4NO_3, Yeast extract, NaCl และศึกษาผลของสภาวะต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่มต่อประสิทธิภาพการผลิตสารเปปไทด์ จากการศึกษาพบว่าเมื่อมี Yeast extract และ NaCl ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลทำให้ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและกิจกรรมจำเพาะได้ดีตามลำดับ ซึ่งความเป็นด่างและอุณหภูมิสูงจะส่งเสริมให้ *B. licheniformis* AnBa9 ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี ถ้าในสภาวะที่เหมาะสม *B. licheniformis* AnBa9 สามารถผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าสภาวะที่ไม่เหมาะสมถึง 25 เท่า ซึ่งคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* มีคุณสมบัติเป็นสารแบคเทอริโอซิน

Matamoros et al. (2009b) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งโดยแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นและนำแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นมาศึกษาต่อเนื่องในการใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นทั้งหมด 5,575 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล พบว่า 132 ไอโซเลท มีคุณสมบัติ

ในการยับยั้งแบคทีเรีย และมีจำนวน 52 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย ได้ 14 ไอโซเลท (สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารทะเลเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรค จากนั้นจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก 7 ไอโซเลท ที่น่าสนใจประกอบด้วย *Leuconostoc gelidum* 3 ไอโซเลท *Lactococcus piscium* 2 ไอโซเลท *Lactobacillus fuchuensis* 1 ไอโซเลท และ *Carnobacterium alterfunditum* 1 ไอโซเลท แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ไม่ผลิตฮิสตามีนและไทรามีน และพบว่าไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนั้นยังได้ศึกษาถึงอัตราการเจริญที่อุณหภูมิต่างกันของ *L. piscium* 1 ไอโซเลท และ *L. gelidum* 1 ไอโซเลท เพื่อยืนยันคุณสมบัติความชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ หนึ่งในเจ็ดเชื้อที่แยกได้สามารถผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ส่วนกลไกในการยับยั้งของเชื้ออื่นที่แยกได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดเนื่องจากการแข่งขันในการจับกับสารตั้งต้น

Hemalatha and Shanthi (2010) ได้ทำการแยก *Bacillus subtilis* จากตัวอย่างนม โดยศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *B. subtilis* จากการศึกษาพบว่า *B. subtilis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Ampicillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Penicillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Erythromycin (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Amoxycillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ *B. subtilis* ทั้งหมดนี้ดื้อต่อ Bacitracin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) *B. subtilis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp. และ *E. coli* ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* ที่สกัดด้วยสารอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท พบว่าสารที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งสารนี้เป็นโปรตีนที่ผลิตจาก *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยโปรตีนมีปริมาณระหว่าง 0.05-0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่าสารที่ผลิตจาก *B. subtilis* เป็นสารเปปไทด์มีน้ำหนักน้อยกว่า 62 กิโลดาลตัน

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารทะเลแปรรูป

1.1 หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก

1.2 หมึกบดอบเนย

1.3 หมึกบดในน้ำเชื่อม

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

2.2 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

2.3 กรรไกรปลอดเชื้อ

2.4 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ

2.5 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) 250 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร

2.6 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette Tips) 200 ไมโครลิตร และ 1,000 ไมโครลิตร

2.7 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร

2.8 ขวดดูแรน (Duran) 250 มิลลิลิตร, 1,000 มิลลิลิตร และ 2,000 มิลลิลิตร

2.9 หลอดทดลอง (Test Tube) 16 x 150 มิลลิลิตร และ 13 x 100 มิลลิลิตร

2.10 กระบอกตวง (Cylinder) 50 มิลลิลิตร, 100 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร

2.11 บีกเกอร์ (Beaker) 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร

2.12 ออโตปิเปต P100 (Gilson, pipetman P100, กรุงปารีส, สาธารณรัฐฝรั่งเศส)

2.13 ออโตปิเปต P1000 (Gilson, pipetman P1000, กรุงปารีส, สาธารณรัฐฝรั่งเศส)

2.14 ตู้อบลมร้อน (Memmert, UFB 500, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

2.15 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, BE 400, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

2.16 หม้อนึ่งความดันไอ (Daihan, Wacs-1450, เมืองโซล, สาธารณรัฐเกาหลี)

2.17 เครื่องบ่มแบบเขย่า (Innova, Innova 4340, รัฐนิวเจอร์ซีย์, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.18 เครื่องแช่เยือกแข็ง (Heto, Lyolab 3000, เมือง Allerod, ราชอาณาจักรเดนมาร์ก)

2.19 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CH30RF200, ประเทศญี่ปุ่น)

2.20 ตู้ปลอดเชื้อ (Super Clean, Super Clean150 VC, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

2.21 ตู้แช่เย็น (Sanden Intercool, SVC-1000SAD, สิงห์บุรี, ประเทศไทย)

2.22 เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (Denver instrument, UB-10, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

2.23 เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (Novasina AG, CH-8853, เมือง lachen, สมาพันธรัฐสวิส)

2.24 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Cintra 400 double beam, เมือง Melbourne, เครือรัฐออสเตรเรีย)

2.25 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Gmbh+Co KG 8450, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

2.26 เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, PG 8025, เมือง Greifensee, สมาพันธรัฐสวิส)

2.27 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen, Universal 32, เมือง Tuttlingen, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

3. สารเคมี

3.1 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.2 Gram's crystal violet solution

3.3 Gram's safranin O solution

3.4 Gram's iodine solution

3.5 Gram's alcohol solution

3.6 Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.7 Catalase reagent

3.8 Oxidase reagent

3.9 Nitrate reagent

3.10 Kovac' s reagent

3.11 Methy red reagent

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 *Bacillus* Medium

4.2 Plate Count Agar (PCA; ยี่ห้อ Difco, เมือง Spark, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.3 Tryptic Soy Broth (TSB; ยี่ห้อ Difco, เมือง Spark, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.4 Tryptic Soy Agar (TSA; ยี่ห้อ Difco, เมือง Spark, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.5 20 % (w/v) Skim milk solution ยี่ห้อ Criterion, เมือง Santa Maria, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

5. แบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติก จำนวน 5 สายพันธุ์ จากห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

วิธีดำเนินการทดลอง

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

1. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แช่เยือกแข็ง (Freezed-dry)

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป ดังต่อไปนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> ทำการเติมผงเซลล์แช่เยือกแข็งของแบคทีเรียโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ดังนี้

ชุดที่ 1 หมึกแปรรูปชนิดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T1)
ชุดที่ 2 หมึกแปรรูปชนิดที่ 1 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T2)
ชุดที่ 3 หมึกแปรรูปชนิดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T3)
ชุดที่ 4 หมึกแปรรูปชนิดที่ 2 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T4)
ชุดที่ 5 หมึกแปรรูปชนิดที่ 3 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T5)
ชุดที่ 6 หมึกแปรรูปชนิดที่ 3 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T6)

<u>การทดลองที่ 2</u> ทำการเติมผงเซลล์แช่เยือกแข็งของแบคทีเรียโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) โดยแบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) ดังนี้

ชุดที่ 7 หมึกแปรรูปชนิดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T7)
ชุดที่ 8 หมึกแปรรูปชนิดที่ 1 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T8)
ชุดที่ 9 หมึกแปรรูปชนิดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T9)
ชุดที่ 10 หมึกแปรรูปชนิดที่ 2 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T10)
ชุดที่ 11 หมึกแปรรูปชนิดที่ 3 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T11)
ชุดที่ 12 หมึกแปรรูปชนิดที่ 3 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T12)

ทำการทดสอบลักษณะของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (a_w) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria และปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria รวมทั้งจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปชนิดต่าง ๆ

(1) การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (a_w)

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปชนิดต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลอง ทำการวัดค่า a_w ด้วยเครื่อง Novasina AG ในวันแรกของการทดลองและวันสุดท้ายของการทดลอง

(2) การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปชนิดต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลอง ในวันแรกและวันสุดท้ายของการทดลอง โดยนำมาผสมในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 และบดตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ)

(3) การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก APHA, 1992; FDA, 1984; Jeyasekaran et al., 2004)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปผสมกับสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:9 และทำการเจือจางด้วยสารละลาย PBS ให้ได้ระดับการเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารละลายในแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar สำหรับตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด อาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus Medium สำหรับตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar สำหรับตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria และอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar สำหรับตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ยกเว้น Plate Count Agar สำหรับตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

2. การประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก

ทำการศึกษาถึงการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งในรูปของส่วนใสเข้มข้น (Concentrated supernatant) และสารกึ่งบริสุทธิ์ (Semipurified agents) ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร (Ananou et al., 2007) โดยทำการประเมินฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

2.1 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก

2.1.1 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเข้มข้น (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ (ได้แก่ *Bacillus subtillis, B. polymyxa, B. thurigiensis, B. megaterium* และ *B. licheniformis*) มาขีด (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticcase Soy Agar (TSA) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticcase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า และนำส่วนใสที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.1.2 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์ (Ahern et al., 2003)

(1) การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์มาขีด (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticcase Soy Agar (TSA) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticcase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20%, 40%, 60% และ 80% ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่ตกตะกอนมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

(2) การศึกษาหาความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์

การตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อทดสอบความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล ทำได้โดยการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ ซึ่งตกตะกอนที่ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 20%, 40%, 60% และ 80% ตามลำดับ นำมาวิเคราะห์กิจกรรม

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* โดยใช้เทคนิค Agar well diffusion method ในการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเชื้อของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์

การแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วต้องมีการกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายเพื่อทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความเข้มข้นขึ้นก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยวิธีไดอะไลซิส ซึ่งเป็นวิธีการแยกโปรตีนออกจากสารโมเลกุลเล็ก ๆ โดยในการทดลองจะนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมมาแยกบรรจุใส่ถุงไดอะไลซิส ในอัตราส่วนสารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ส่วน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ภายหลังเวลาผ่านไป 1, 2 และ 4 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไดอะไลซิสมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

3.1 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมากที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยทำการตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่มก่อโรคและปนเปื้อนในอาหาร 9 ชนิด ดังนี้

(1) แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโรปทั้งหมด (Jeyasekaran et al., 2004)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher ทำการเจือจางให้ได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate จากนั้นนำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

(2) แบคทีเรียกลุ่มชอบความเย็น (FDA, 1984; APHA, 1992)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher ทำการเจือจางให้ได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate จากนั้นนำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

(3) แบคทีเรียกลุ่มผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Shirazinejad et al., 2010)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher ทำการเจือจางให้ได้ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

(4) แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* (Shirazinejad et al., 2010)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher ทำการเจือจางให้ได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Isolation agar (PIA) ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

(5) แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* (BAM, 1998)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน Butterfield's Phosphate – Buffered Dilution Water (BF) ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด BF 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} เจือจางตัวอย่างโดยวิธีเดียวกันจนถึง 10^{-3} ถ่ายตัวอย่างที่ระดับการเจือจากที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose (LST) broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายตัวอย่างจากหลอดอาหาร LST broth ที่เกิดก๊าซ โดยใช้ลูปแตะเชื้อขึ้นมา 1 ลูป ถ่ายลงในอาหาร Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซแล้วอ่านค่าปริมาณโคลิฟอร์มจากตาราง MPN จากนั้นถ่ายตัวอย่างจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB broth ที่เกิดก๊าซมาใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth แล้วนำไปบ่มที่ 45.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซแล้วอ่านค่าปริมาณโคลิฟอร์มจากตาราง MPN แล้วขีดแยกเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's Eosin Methylene Blue (L-EMB) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเฉพาะของ *E. coli* จานละ 5 โคโลนี เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาย้อมแกรม ทดสอบ IMViC โดย *E. coli* ให้ผลทดสอบเป็น ++-- (*E. coli* biotype 1) หรือ -+-- (*E. coli* biotype 2)

(6) *Staphylococcus aureus* (BAM, 1998)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน Butterfield's Phosphate – Buffered Dilution Water (BF) จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด BF 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} เจือจางตัวอย่างโดยวิธีเดียวกันจนถึง 10^{-3} ถ่ายตัวอย่างที่ระดับการเจือจากที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) ที่เติม 10% (w/v) NaCl และ 1% Sodium pyruvate ความเข้มข้นละ 3 หลอด รวม 9 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่ขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อ บันทึกผล และถ่ายเชื้อจากหลอดที่ขุ่นด้วยการขีดแยกเชื้อ (Streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Egg-yolk Tellurite Agar (BPA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* บนจานเพาะเชื้อ ได้แก่ โคโลนีขนาด 1.5 มิลลิเมตรหรือใหญ่กว่า ผิวเรียบ นูน ขอบเรียบ สีดำ น้ำตาลหรือสีเทาเข้ม มีวงขุ่นรอบโคโลนี และ/หรือ มีวงใสใต้วงขุ่น จานละ 2-3 โคโลนี นำแต่ละโคโลนีมาทดสอบการผลิต coagulase (โคแอกูเลส)

การทดสอบเอนไซม์โคแอกูเลส

ปิเปตพลาสมากระต่ายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดที่มีพลาสมา บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผล 1, 2 และ 6 ชั่วโมง

การอ่านผล *S. aureus* จะทำให้พลาสมาจับตัวเป็นก้อน (Clot) ในปริมาณมากกว่า 1/3 ของปริมาตรของเหลวทั้งหมด หากพลาสมาจับตัวเป็นก้อนแข็งทั้งหมดจะไม่ไหลเมื่อเอียงหลอด สำหรับระดับของการจับตัวดังกล่าว มีดังนี้

0 ไม่เกิดการจับตัว
1+ จับตัวเป็นก้อนน้อย ไม่รวมกลุ่ม
2+ จับตัวเป็นก้อนน้อย รวมกลุ่ม
3+ จับตัวเป็นก้อนใหญ่
4+ จับตัวเป็นก้อนหมดทั้งหลอดและไม่ขยับเมื่อคว่ำหลอด

การรายงานผล

นับจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวกของแต่ละความเข้มข้น บันทึกผลเป็นบวกเมื่อลักษณะการจับตัวอยู่ในระดับ 3+ และ 4+ และบันทึกผลเป็นลบ เมื่อลักษณะการจับตัวอยู่ในระดับ 0, 1+, และ 2+ นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN 3:3:3 รายงานผล *Staphylococcus* Coagulase Positive ที่ได้โดยมีหน่วยเป็น MPN/g ตัวอย่าง

(7) *Salmonella* (BAM, 1998)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน Lactose broth จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate (TT) broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และถ่ายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis (RV) medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 และ 45±0.2 องศาเซลเซียส ตามลำดับคัดเลือกหลอดที่ขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดที่ขุ่นด้วยการขีดแยกเชื้อ (Streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen enteric (HE) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Salmonella* จะมีโคโลนีสีเขียวแกมน้ำเงิน อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง บางโคโลนีอาจมีสีดำขนาดใหญ่ตรงกลางหรือเกือบทั้งโคโลนี จากนั้นนำโคโลนีดังกล่าวมาเพาะไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar แล้วนำมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

1) Triple Super Iron agar (TSI)
2) Lysine Iron agar (LIA)
3) Urea agar
4) Indole production test
5) Motility test

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ

(8) แบคทีเรียกลุ่มผลิตฮิสตามีน (Niven et al., 1981; Huang et al., 2010)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน Butterfield's Phosphate – Buffered Dilution Water (BF) จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด BF 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} เจือจางตัวอย่างโดยวิธีเดียวกันจนถึง 10^{-6} ถ่ายตัวอย่างที่ระดับการเจือจากที่ 10^{-1}- 10^{-6} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Histamine-forming bacterium isolation (HBI) agar ที่เติม L-histidine จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ โคโลนีสีฟ้าหรือสีม่วง บันทึกผล

(9) ราและยีสต์ (BAM, 1998)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher จะได้ตัวอย่างระดับความเจือจาง 10^{-1} ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปผสมด้วยเครื่อง Vortex mixer จะได้ตัวอย่างระดับ

ความเจือจาง 10^{-2} แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกันจนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} ปิเปตสารละลายตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจาง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar ความเจือจางละ 3 ซ้ำ เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ) นับจำนวนโคโลนีของราและยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี และบันทึกผล

3.2 การออกแบบการทดลองของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

จากการศึกษาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปจากข้อ 3.1 ที่พบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเพียงกลุ่มเดียว ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงทำการศึกษาถึงผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป โดยทำการออกแบบการทดลองดังนี้

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป ชนิดหมึกอบแห้งที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี มาตัดให้มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2 x 2 เซนติเมตร นำตัวอย่างที่ได้มาทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ *(Bacillus subtillis, B. polymyxa, B. thurigiensis, B. megaterium* และ *B. licheniformis)* ในรูปของส่วนใสเข้มข้นและสารกึ่งบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารเคมีสังเคราะห์ คือ กรดแลคติก และผลิตภัณฑ์แบคเทอริโอซินทางการค้า คือ ไนซิน ที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารในปัจจุบัน ซึ่งแบ่งเป็นชุดการทดลองดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น (T1: CBL)

ชุดที่ 2 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. megaterium* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น (T2: CBM)

ชุดที่ 3 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtillis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น (T3: CBS)

ชุดที่ 4 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. polymyxa* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น (T4: CBP)

ชุดที่ 5 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. thurigiensis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น (T5: CBT)

ชุดที่ 6 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ในรูปของส่วนใสเข้มข้น (T6: MixC)

ชุดที่ 7 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (T7: PBL)

ชุดที่ 8 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. megaterium* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (T8: PBM)

ชุดที่ 9 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtillis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (T9: PBS)

ชุดที่ 10 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. polymyxa* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (T10: PBP)

ชุดที่ 11 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. thurigiensis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (T11: PBT)

ชุดที่ 12 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (T12: MixP)

ชุดที่ 13 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารละลายไนซินความเข้มข้น 1000 IU/ml (C1: Nisin)

ชุดที่ 14 หมึกแปรรูปเติมด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (C2: Lactic acid)

ชุดที่ 15 หมึกแปรรูปเติมด้วยน้ำกลั่น (C3: น้ำกลั่น)

เติมสารเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างหมึกแปรรูป จากนั้นนำตัวอย่างหมึกแปรรูปมาเก็บรักษาในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แล้วนำมาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างมาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา ในวันที่ 0, 1, 7, 14, 21 และ 28 ต่อไป

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของปริมาณแบคทีเรีย และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี One - way ANOVA และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Ducan's Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เวอร์ชัน 17.0

บทที่ 4
ผลการทดลอง

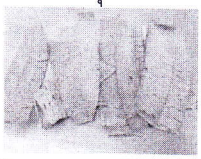
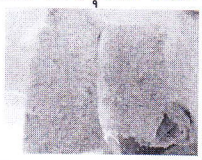
จากการศึกษาการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป โดยทำการศึกษาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แช่เยือกแข็ง รวมทั้งการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การตรวจสอบลักษณะและคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

1.1 ลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

จากการศึกษาลักษณะทางกายกายภาพของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ได้แก่ หมึกบด จำนวน 3 ชนิด ที่จำหน่ายในบริเวณตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี พบว่าหมึกบดทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

ตัวอย่าง	ลักษณะ	ราคา (บาท)
หมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมาก	เป็นแผ่น ผิวขรุขระ แห้ง สีส้ม  (ภาพโดยเทวินทร์ แสนเสนยา)	700 บาท/กิโลกรัม
หมึกแห้งบดอบเนย	เป็นแผ่น ผิวขรุขระ แห้ง สีส้ม  (ภาพโดยเทวินทร์ แสนเสนยา)	700 บาท/กิโลกรัม
หมึกแห้งบดในน้ำเชื่อม	เป็นแผ่น ผิวขรุขระ เปียก สีส้ม  (ภาพโดยเทวินทร์ แสนเสนยา)	450 บาท/กิโลกรัม

1.2 คุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งแปรรูป

1.2.1 ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) ต่อค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

1.2.1.1 ผลของการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปในวันแรกของการทดลอง

จากการศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อมในวันแรกของการทดลองพบว่า ทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T1, T3, T5, T7, T9 และ T11) มีค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้อยู่ในช่วง 0.4423 ± 0.0032 ถึง 0.5846 ± 0.0095 และชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T2, T4, T6, T8, T10 และ T12) มีค่าอยู่ในช่วง 0.4233 ± 0.0055 ถึง 0.5673 ± 0.0091 จากการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก และชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก พบว่ามีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยผลิตภัณฑ์ที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในขั้นตอนการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3

1.2.1.2 ผลของอุณหภูมิในการจัดเก็บต่อค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน ต่อปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ โดยชุดการทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน (T1, T2, T3, T4, T5 และ T6) มีรูปแบบเหมือนกันกล่าวคือมีการคงที่ของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยมีปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บรักษาอยู่ในช่วง 0.4477 ± 0.0119 - 0.5820 ± 0.0056 และ 0.4743 ± 0.0012 - 0.5913 ± 0.0092 ตามลำดับ ยกเว้นในชุดการทดลองหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมากเติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T1) และชุดหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก (T2) ที่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ในชุดการทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน (T7, T8, T9, T10, T11 และ T12) ของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บรักษาอยู่ในช่วง 0.4263 ± 0.0051 - 0.4670

± 0.0025 และ 0.4727 ± 0.0021 - 0.5123 ± 0.0042 ตามลำดับ ยกเว้นในชุดการทดลองหมึกบดในน้ำเชื่อมเติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T11) และชุดหมึกบดในน้ำเชื่อมไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T12) ที่พบการคงที่ของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 3

1.2.1.3 ผลของระยะเวลาในการจัดเก็บต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชุดการทดลองและชุดควบคุม (T1, T2, T3, T4, T5 และ T6) ในวันแรกของการทดลองมีค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้อยู่ในช่วง 0.4233 ± 0.0055- 0.5820 ± 0.0056 และในวันสุดท้ายของการทดลอง มีค่าอยู่ในช่วง 0.4727 ± 0.0021 - 0.5913 ± 0.0092 จากการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในวันแรกของการทดลองกับวันสุดท้ายของการทดลอง พบว่ามีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชุดการทดลองและชุดควบคุม (T7, T8, T9, T10, T11 และ T12) ในวันแรกของการทดลองมีค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้อยู่ในช่วง 0.4263 ± 0.0051 - 0.5846 ± 0.0095 และในวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 0.4613 ± 0.0058 - 0.5967 ± 0.0025 จากการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในวันแรกของการทดลองกับวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า มีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระยะเวลาในการจัดเก็บไม่มีผลต่อค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (a_w) ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

ตัวอย่าง	ระยะเวลาทดลอง (วัน)	
	วันที่ 0	วันที่ 28
T1	0.4423 ± 0.0032 ^{e,1}	0.4727 ± 0.0021 ^{e,1}
T2	0.4233 ± 0.0055 ^{f,1}	0.4880 ± 0.0046 ^{d,1}
T3	0.4660 ± 0.0079 ^{e,1}	0.5123 ± 0.0042 ^{c,1}
T4	0.4477 ± 0.0119 ^{e,1}	0.4863 ± 0.0021 ^{d,1}
T5	0.5820 ± 0.0056 ^{b,2}	0.5913 ± 0.0092 ^{a,1}
T6	0.5630 ± 0.0045 ^{c,1}	0.5750 ± 0.0026 ^{a,1}
T7	0.4453 ± 0.0112 ^{e,1}	0.4613 ± 0.0058 ^{f,1}
T8	0.4263 ± 0.0051 ^{f,1}	0.4630 ± 0.0046 ^{f,1}
T9	0.4670 ± 0.0025 ^{e,1}	0.4743 ± 0.0012 ^{e,1}
T10	0.4473 ± 0.0104 ^{e,1}	0.4753 ± 0.0006 ^{e,1}
T11	0.5846 ± 0.0095 ^{a,1}	0.5967 ± 0.0025 ^{a,1}
T12	0.5673 ± 0.0091 ^{bc,1}	0.5937 ± 0.0110 ^{b,1}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T2: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T3: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T4: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T5: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T6: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T7: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T8: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T9: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T10: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T11: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T12: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

1.2.2 ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) ต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

1.2.2.1 ผลของการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปในวันแรกของการทดลอง

จากการศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก, หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อมในวันแรกของการทดลองพบว่า ทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T1, T3, T5, T7, T9 และ T11) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.64 ± 0.01 ถึง 6.36 ± 0.04 และชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T2, T4, T6, T8, T10 และ T12) มีค่าอยู่ในช่วง 5.33 ± 0.01 ถึง 6.36 ± 0.02 จากการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก และชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก พบว่ามีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในขั้นตอนการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

1.2.2.2 ผลของอุณหภูมิในการจัดเก็บต่อค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน ต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ โดยชุดการทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน (T1, T2, T3, T4, T5 และ T6) มีรูปแบบเหมือนกันกล่าวคือค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างในวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บรักษาอยู่ในช่วง 5.34 ± 0.02 – 6.36 ± 0.04 และ 5.33 ± 0.02 – 6.43 ± 0.03 ตามลำดับ ยกเว้นในชุดการทดลองหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมากที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T2) ที่พบการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด-ด่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ในชุดการทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน (T7, T8, T9, T10, T11 และ T12) ของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างในวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บรักษาอยู่ในช่วง 5.33 ± 0.01 – 6.35 ± 0.01 และ 5.31 ± 0.04 – 6.52 ± 0.06 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 4

1.2.2.4 ผลของระยะเวลาในการจัดเก็บต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชุดการทดลองและชุดควบคุม (T1, T2, T3, T4, T5 และ T6) ในวันแรกของการทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.34 ± 0.02 – 6.36 ± 0.04 และในวันสุดท้ายของการทดลอง มีค่าอยู่ในช่วง 5.33 ± 0.02 – 6.43 ± 0.03 จากการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในวันแรกของการทดลองกับวันสุดท้ายของการทดลองพบว่ามีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าชุดการทดลองและชุดควบคุม (T7, T8, T9, T10, T11 และ T12) ในวันแรกของการทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.33 ± 0.01 – 6.34 ± 0.00 และในวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 5.31 ± 0.04 – 6.52 ± 0.06 จากการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในวันแรกของการทดลองกับวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า มีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระยะเวลาในการจัดเก็บไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง

ตารางที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาทดลอง	
	วันที่ 0	วันที่ 28
T1	6.36 ± 0.04 ^{a,1}	6.40 ± 0.02 ^{bcd,1}
T2	6.36 ± 0.02 ^{a,2}	6.43 ± 0.03 ^{bc,1}
T3	6.33 ± 0.01 ^{a,1}	6.34 ± 0.02 ^{d,1}
T4	6.35 ± 0.02 ^{a,1}	6.34 ± 0.02 ^{d,1}
T5	5.72 ± 0.06 ^{b,1}	5.82 ± 0.06 ^{e,1}
T6	5.34 ± 0.02 ^{d,1}	5.33 ± 0.02 ^{g,1}
T7	6.32 ± 0.02 ^{a,2}	6.45 ± 0.02 ^{ab,1}
T8	6.33 ± 0.01 ^{a,1}	6.52 ± 0.06 ^{a,2}
T9	6.34 ± 0.00 ^{a,1}	6.37 ± 0.04 ^{cd,1}
T10	6.35 ± 0.01 ^{a,1}	6.34 ± 0.02 ^{d,1}
T11	5.64 ± 0.01 ^{c,2}	5.54 ± 0.03 ^{f,1}
T12	5.33 ± 0.01 ^{d,1}	5.31 ± 0.04 ^{g,1}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T2: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T3: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T4: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T5: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T6: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T7: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T8: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T9: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T10: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T11: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T12: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

1.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried)

จากการเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) โดยใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นเพื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร ให้ได้ 2.0 AU และทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium พบว่ามีปริมาณเชื้อ $2.45 \pm 0.92 \times 10^8$ และ $2.53 \pm 0.39 \times 10^8$ CFU/g ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสมาทำให้อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium พบว่ามีปริมาณเท่ากับ $3.80 \pm 0.70 \times 10^8$ และ $2.75 \pm 0.78 \times 10^8$ CFU/mL ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส เนื่องจากไม่ทำให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่ค่าการดูดกลืนแสง 2.0 AU และที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried)

แบคทีเรีย	ปริมาณของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (CFU/ mL)	
	PCA	Bacillus Medium
แบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส (ค่าการดูดกลืนแสง 2.0 AU)	$2.45 \pm 0.92 \times 10^8$	$2.53 \pm 0.39 \times 10^8$
แบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส (Freeze dried)	$3.80 \pm 0.70 \times 10^8$	$2.75 \pm 0.78 \times 10^8$

2. ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและผลของโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ

2.1 ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกมีรูปแบบเหมือนกัน โดยชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก; T1,หมึกบดอบเนย; T3 และหมึกบดในน้ำเชื่อม; T5) มีการลดลงของปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก

ทั้งหมดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาเท่ากับ $2.23 \pm 0.25 \times 10^5$, $5.27 \pm 0.49 \times 10^6$ และ $1.25 \pm 0.46 \times 10^6$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส (หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก; T7,หมึกบดอบเนย; T9 และหมึกบดในน้ำเชื่อม; T11) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่มีปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาเท่ากับ $2.75 \pm 0.26 \times 10^5$, $4.44 \pm 0.22 \times 10^5$ และ $6.32 \pm 0.42 \times 10^5$ CFU/g ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปชนิดหมึกบดอบเนยเสริมโพรไบโอติกที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถลดอัตราการตายของแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้สูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่รอดชีวิตในหมึกแปรรูปโดยจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสทั้งหมด (CFU/g)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T1	$1.60 \pm 0.26 \times 10^{8\ a,1}$	$3.42 \pm 0.34 \times 10^{7\ a,2}$	$2.70 \pm 0.10 \times 10^{7\ a,3}$	$2.20 \pm 0.17 \times 10^{6\ b,4}$	$3.32 \pm 0.31 \times 10^{5\ de,5}$	$2.48 \pm 0.12 \times 10^{5\ ef,6}$	$2.16 \pm 0.24 \times 10^{5\ e,6}$
T2	$1.45 \pm 0.34 \times 10^{3\ e,1}$	$1.22 \pm 0.15 \times 10^{3\ d,1}$	$1.13 \pm 0.21 \times 10^{3\ d,1}$	$1.14 \pm 0.34 \times 10^{3\ e,1}$	$1.34 \pm 0.18 \times 10^{3\ fg,1}$	$1.50 \pm 0.29 \times 10^{3\ g,1}$	$1.44 \pm 0.35 \times 10^{3\ f,1}$
T3	$1.56 \pm 0.33 \times 10^{8\ ab,1}$	$1.68 \pm 0.12 \times 10^{7\ b,2}$	$1.86 \pm 0.64 \times 10^{7\ b,2}$	$3.48 \pm 0.26 \times 10^{6\ a,3}$	$3.48 \pm 0.43 \times 10^{6\ a,3}$	$3.52 \pm 0.19 \times 10^{6\ a,3}$	$3.34 \pm 0.45 \times 10^{6\ a,3}$
T4	$6.30 \pm 0.87 \times 10^{5\ c,1}$	$3.98 \pm 0.85 \times 10^{5\ d,2}$	$2.92 \pm 0.75 \times 10^{5\ d,3}$	$2.65 \pm 0.66 \times 10^{5\ d,3}$	$4.04 \pm 0.50 \times 10^{5\ d,2}$	$3.90 \pm 0.68 \times 10^{5\ d,2}$	$5.92 \pm 0.45 \times 10^{5\ c,1}$
T5	$1.15 \pm 0.19 \times 10^{8\ ab,1}$	$1.10 \pm 0.17 \times 10^{7\ c,2}$	$1.34 \pm 0.43 \times 10^{7\ c,2}$	$2.28 \pm 0.18 \times 10^{6\ b,3}$	$1.51 \pm 0.07 \times 10^{6\ b,4}$	$1.16 \pm 0.09 \times 10^{6\ b,5}$	$1.29 \pm 0.44 \times 10^{6\ b,45}$
T6	$1.30 \pm 0.20 \times 10^{3\ e,1}$	$2.30 \pm 0.43 \times 10^{3\ d,2}$	$1.32 \pm 0.25 \times 10^{3\ d,1}$	$1.36 \pm 0.10 \times 10^{3\ e,1}$	$1.44 \pm 0.12 \times 10^{3\ f,1}$	$1.48 \pm 0.28 \times 10^{3\ g,1}$	$1.54 \pm 0.18 \times 10^{3\ f,1}$
T7	$1.45 \pm 0.64 \times 10^{8\ ab,1}$	$3.38 \pm 0.30 \times 10^{7\ a,2}$	$2.60 \pm 0.26 \times 10^{7\ a,3}$	$1.46 \pm 0.24 \times 10^{6\ c,4}$	$3.18 \pm 0.62 \times 10^{5\ e,5}$	$1.92 \pm 0.36 \times 10^{5\ f,6}$	$2.40 \pm 0.25 \times 10^{5\ e,6}$
T8	$1.37 \pm 0.23 \times 10^{3\ e,1}$	$1.28 \pm 0.25 \times 10^{3\ d,1}$	$1.25 \pm 0.06 \times 10^{3\ d,1}$	$1.08 \pm 0.24 \times 10^{3\ e,1}$	$1.28 \pm 0.35 \times 10^{3\ fg,1}$	$1.04 \pm 0.11 \times 10^{3\ g,1}$	$1.00 \pm 0.07 \times 10^{3\ f,1}$
T9	$1.12 \pm 0.49 \times 10^{8\ b,1}$	$1.78 \pm 0.19 \times 10^{7\ b,2}$	$1.50 \pm 0.30 \times 10^{7\ bc,3}$	$2.40 \pm 0.33 \times 10^{6\ b,4}$	$7.73 \pm 0.51 \times 10^{5\ c,5}$	$7.00 \pm 0.67 \times 10^{5\ c,5}$	$5.35 \pm 0.64 \times 10^{5\ cd,6}$
T10	$2.86 \pm 0.70 \times 10^{5\ d,1}$	$2.94 \pm 0.83 \times 10^{5\ d,1}$	$3.33 \pm 0.35 \times 10^{5\ d,1}$	$2.08 \pm 0.39 \times 10^{5\ de,1}$	$3.58 \pm 0.21 \times 10^{5\ de,1}$	$3.33 \pm 0.21 \times 10^{5\ de,1}$	$3.48 \pm 0.45 \times 10^{5\ de,1}$
T11	$1.46 \pm 0.30 \times 10^{8\ ab,1}$	$1.80 \pm 0.23 \times 10^{7\ b,2}$	$1.12 \pm 0.36 \times 10^{7\ c,3}$	$1.34 \pm 0.19 \times 10^{6\ c,4}$	$3.76 \pm 0.27 \times 10^{5\ de,5}$	$3.14 \pm 0.13 \times 10^{5\ de,56}$	$2.60 \pm 0.44 \times 10^{5\ e,6}$
T12	$1.78 \pm 0.32 \times 10^{3\ e,1}$	$1.38 \pm 0.48 \times 10^{3\ d,2}$	$1.30 \pm 0.10 \times 10^{3\ d,2}$	$1.18 \pm 0.01 \times 10^{3\ e,2}$	$1.10 \pm 0.22 \times 10^{3\ g,2}$	$1.22 \pm 0.13 \times 10^{3\ g,2}$	$1.15 \pm 0.21 \times 10^{3\ f,2}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
T1: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T2: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T3: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T4: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T5: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T6: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T7: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T8: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T9: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T10: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T11: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T12: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

2.2 ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม ในวันแรกของการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดของหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม มีรูปแบบเหมือนกันกล่าวคือ ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T1, T3, T5, T7, T9 และ T11) มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.28 \pm 0.19 \times 10^{8}$ - $2.15 \pm 0.54 \times 10^{8}$ CFU/g ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T2, T4, T6, T8, T10 และ T12) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกได้แก่ หมึกบดอบเนยที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $5.48 \pm 0.88 \times 10^{5}$ - $7.10 \pm 0.58 \times 10^{5}$ CFU/g รองลงมาคือหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมากมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.45 \pm 0.19 \times 10^{3}$ - $1.83 \pm 0.54 \times 10^{3}$ CFU/g และหมึกบดในน้ำเชื่อมที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.45 \pm 0.13 \times 10^{3}$ - $2.23 \pm 0.45 \times 10^{3}$ CFU/g ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด เป็นผลมาจากการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในหมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T1	$1.70 \pm 0.17 \times 10^{8\ ab,1}$	$6.75 \pm 0.96 \times 10^{7\ a,2}$	$3.20 \pm 0.83 \times 10^{7\ ab,3}$	$2.48 \pm 0.36 \times 10^{6\ b,4}$	$4.37 \pm 0.33 \times 10^{5\ de,5}$	$3.32 \pm 0.33 \times 10^{5\ e,6}$	$2.23 \pm 0.25 \times 10^{5\ g,7}$
T2	$1.83 \pm 0.54 \times 10^{3\ fg,1}$	$1.54 \pm 0.27 \times 10^{3\ e,1}$	$1.85 \pm 0.60 \times 10^{3\ f,1}$	$1.60 \pm 0.35 \times 10^{3\ f,1}$	$1.56 \pm 0.22 \times 10^{3\ f,1}$	$1.58 \pm 0.31 \times 10^{3\ f,1}$	$1.56 \pm 0.11 \times 10^{3\ h,1}$
T3	$1.73 \pm 0.15 \times 10^{8\ ab,1}$	$2.67 \pm 0.12 \times 10^{7\ cd,2}$	$2.40 \pm 0.20 \times 10^{7\ bc,2}$	$4.30 \pm 0.22 \times 10^{6\ a,4}$	$3.90 \pm 0.10 \times 10^{6\ a,1}$	$5.50 \pm 0.47 \times 10^{6\ a,3}$	$5.27 \pm 0.49 \times 10^{6\ a,3}$
T4	$7.10 \pm 0.58 \times 10^{5\ d,1}$	$6.32 \pm 0.52 \times 10^{5\ e,2}$	$4.62 \pm 0.93 \times 10^{5\ e,2}$	$3.55 \pm 0.25 \times 10^{5\ e,3}$	$4.87 \pm 0.71 \times 10^{5\ d,2}$	$5.43 \pm 0.78 \times 10^{5\ d,2}$	$5.68 \pm 0.81 \times 10^{5\ c,2}$
T5	$1.28 \pm 0.19 \times 10^{8\ c,1}$	$3.25 \pm 0.96 \times 10^{7\ c,2}$	$2.65 \pm 0.31 \times 10^{7\ bc,2}$	$2.58 \pm 0.31 \times 10^{6\ b,3}$	$1.64 \pm 0.20 \times 10^{6\ b,4}$	$1.49 \pm 0.11 \times 10^{6\ b,4}$	$1.25 \pm 0.46 \times 10^{6\ b,5}$
T6	$1.45 \pm 0.13 \times 10^{3\ g,1}$	$3.17 \pm 0.94 \times 10^{3\ e,2}$	$1.38 \pm 0.30 \times 10^{3\ f,1}$	$1.63 \pm 0.30 \times 10^{3\ f,1}$	$1.80 \pm 0.26 \times 10^{3\ f,1}$	$1.56 \pm 0.34 \times 10^{3\ f,1}$	$1.60 \pm 0.25 \times 10^{3\ h,1}$
T7	$1.80 \pm 0.73 \times 10^{8\ ab,1}$	$4.20 \pm 0.84 \times 10^{7\ b,2}$	$3.75 \pm 0.96 \times 10^{7\ a,2}$	$1.84 \pm 0.34 \times 10^{6\ c,3}$	$3.36 \pm 0.36 \times 10^{5\ e,4}$	$2.00 \pm 0.25 \times 10^{5\ e,4}$	$2.75 \pm 0.26 \times 10^{5\ f,5}$
T8	$1.45 \pm 0.19 \times 10^{3\ g,1}$	$1.30 \pm 0.26 \times 10^{3\ e,1}$	$1.40 \pm 0.10 \times 10^{3\ f,1}$	$1.42 \pm 0.15 \times 10^{3\ fg,1}$	$1.32 \pm 0.34 \times 10^{3\ f,1}$	$1.08 \pm 0.20 \times 10^{3\ f,1}$	$1.14 \pm 0.09 \times 10^{3\ i,1}$
T9	$2.15 \pm 0.54 \times 10^{8\ a,1}$	$2.05 \pm 0.44 \times 10^{7\ d,2}$	$1.96 \pm 0.27 \times 10^{7\ cd,2}$	$2.65 \pm 0.21 \times 10^{6\ b,3}$	$9.28 \pm 0.64 \times 10^{5\ c,4}$	$8.23 \pm 0.64 \times 10^{5\ c,4}$	$6.32 \pm 0.42 \times 10^{5\ c,5}$
T10	$5.48 \pm 0.88 \times 10^{5\ e,1}$	$6.98 \pm 0.25 \times 10^{5\ e,1}$	$5.30 \pm 0.51 \times 10^{5\ e,1}$	$3.12 \pm 0.26 \times 10^{5\ e,1}$	$3.90 \pm 0.76 \times 10^{5\ de,1}$	$3.64 \pm 0.40 \times 10^{5\ de,1}$	$4.44 \pm 0.22 \times 10^{5\ d,1}$
T11	$1.55 \pm 0.24 \times 10^{8\ bc,1}$	$2.04 \pm 0.48 \times 10^{7\ d,2}$	$1.52 \pm 0.35 \times 10^{7\ d,3}$	$1.46 \pm 0.26 \times 10^{6\ d,4}$	$3.78 \pm 0.51 \times 10^{5\ e,5}$	$3.78 \pm 0.34 \times 10^{5\ de,5}$	$3.43 \pm 0.29 \times 10^{5\ e,5}$
T12	$2.23 \pm 0.45 \times 10^{3\ f,1}$	$1.93 \pm 0.21 \times 10^{3\ e,1}$	$1.56 \pm 0.27 \times 10^{3\ f,2}$	$1.24 \pm 0.18 \times 10^{3\ g,21}$	$1.14 \pm 0.11 \times 10^{3\ f,3}$	$1.28 \pm 0.27 \times 10^{3\ f,21}$	$1.40 \pm 0.22 \times 10^{3\ h,21}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T2: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T3: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T4: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T5: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T6: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T7: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T8: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T9: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T10: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T11: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T12: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

2.3 ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม ในวันแรกของการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria ของหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม มีรูปแบบเหมือนกันกล่าวคือ ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T1, T3, T5, T7, T9 และ T11) มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria อยู่ในช่วง $3.47 \pm 0.25 \times 10^{8} - 3.97 \pm 0.72 \times 10^{8}$ CFU/g ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (T2, T4, T6, T8, T10 และ T12) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria อยู่ในช่วง $3.37 \pm 0.21 \times 10^{3} - 3.98 \pm 0.28 \times 10^{5}$ CFU/g แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด เป็นผลมาจากการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious bacteria ในหมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Fastidiaus bacteria (CFU/g)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T1	$3.80 \pm 0.50 \times 10^{8\ a,1}$	$3.60 \pm 0.30 \times 10^{7\ ab,2}$	$2.50 \pm 0.18 \times 10^{7\ ab,3}$	$2.00 \pm 0.55 \times 10^{6\ bc,4}$	$3.43 \pm 0.35 \times 10^{5\ bc,5}$	$3.37 \pm 0.51 \times 10^{5\ b,5}$	$3.18 \pm 0.45 \times 10^{5\ b,5}$
T2	$3.47 \pm 0.06 \times 10^{3\ c,123}$	$4.23 \pm 0.21 \times 10^{3\ d,1}$	$2.87 \pm 0.80 \times 10^{3\ e,34}$	$2.52 \pm 0.20 \times 10^{3\ e,4}$	$3.22 \pm 0.33 \times 10^{3\ d,234}$	$3.25 \pm 0.31 \times 10^{3\ d,234}$	$4.02 \pm 0.56 \times 10^{3\ d,12}$
T3	$3.73 \pm 0.08 \times 10^{8\ a,1}$	$4.37 \pm 0.76 \times 10^{7\ a,2}$	$2.88 \pm 0.37 \times 10^{7\ ab,3}$	$2.68 \pm 0.63 \times 10^{6\ ab,4}$	$3.32 \pm 0.29 \times 10^{6\ a,4}$	$3.35 \pm 0.33 \times 10^{6\ a,4}$	$3.08 \pm 0.28 \times 10^{6\ a,4}$
T4	$3.90 \pm 0.20 \times 10^{5\ b,1}$	$3.57 \pm 0.76 \times 10^{5\ c,1}$	$2.52 \pm 0.70 \times 10^{5\ d,23}$	$2.28 \pm 0.23 \times 10^{5\ d,3}$	$3.12 \pm 0.38 \times 10^{5\ c,123}$	$3.30 \pm 0.10 \times 10^{5\ b,12}$	$3.65 \pm 0.52 \times 10^{5\ b,1}$
T5	$3.63 \pm 0.35 \times 10^{8\ a,1}$	$3.23 \pm 0.50 \times 10^{7\ b,2}$	$1.75 \pm 0.09 \times 10^{7\ c,3}$	$3.62 \pm 0.38 \times 10^{6\ a,4}$	$3.38 \pm 0.16 \times 10^{6\ a,4}$	$3.85 \pm 0.27 \times 10^{5\ b,5}$	$3.15 \pm 0.30 \times 10^{5\ b,6}$
T6	$3.62 \pm 0.03 \times 10^{3\ c,12}$	$3.83 \pm 0.50 \times 10^{3\ de,1}$	$2.77 \pm 0.40 \times 10^{3\ e,3}$	$3.03 \pm 0.40 \times 10^{3\ e,23}$	$2.68 \pm 0.08 \times 10^{3\ e,3}$	$3.37 \pm 0.13 \times 10^{3\ d,12}$	$3.37 \pm 0.32 \times 10^{3\ d,12}$
T7	$3.97 \pm 0.72 \times 10^{8\ a,1}$	$3.63 \pm 0.60 \times 10^{7\ ab,2}$	$3.20 \pm 0.22 \times 10^{7\ a,2}$	$1.60 \pm 0.20 \times 10^{6\ c,4}$	$3.63 \pm 0.60 \times 10^{6\ a,3}$	$2.63 \pm 0.10 \times 10^{5\ c,5}$	$3.33 \pm 0.20 \times 10^{4\ c,6}$
T8	$3.70 \pm 0.36 \times 10^{3\ c,1}$	$3.87 \pm 0.35 \times 10^{3\ de,1}$	$1.43 \pm 0.32 \times 10^{3\ f,2}$	$2.18 \pm 0.84 \times 10^{3\ ef,2}$	$3.32 \pm 0.28 \times 10^{3\ d,1}$	$3.08 \pm 0.03 \times 10^{3\ d,1}$	$3.77 \pm 0.55 \times 10^{3\ d,1}$
T9	$3.78 \pm 0.03 \times 10^{8\ a,1}$	$4.27 \pm 0.47 \times 10^{7\ a,2}$	$1.78 \pm 0.47 \times 10^{7\ c,3}$	$1.68 \pm 0.12 \times 10^{6\ c,4}$	$3.72 \pm 0.40 \times 10^{5\ b,4}$	$3.58 \pm 0.58 \times 10^{5\ b,4}$	$3.52 \pm 0.45 \times 10^{5\ b,4}$
T10	$3.98 \pm 0.28 \times 10^{5\ b,1}$	$3.57 \pm 0.42 \times 10^{5\ c,12}$	$2.73 \pm 0.32 \times 10^{5\ d,34}$	$2.13 \pm 0.60 \times 10^{5\ d,4}$	$3.88 \pm 0.08 \times 10^{5\ b,12}$	$3.65 \pm 0.43 \times 10^{5\ b,12}$	$3.22 \pm 0.44 \times 10^{5\ b,23}$
T11	$3.47 \pm 0.25 \times 10^{8\ a,1}$	$3.70 \pm 0.35 \times 10^{7\ ab,2}$	$2.13 \pm 0.55 \times 10^{7\ bc,2}$	$1.48 \pm 0.55 \times 10^{6\ c,3}$	$3.53 \pm 0.32 \times 10^{5\ bc,3}$	$3.62 \pm 0.58 \times 10^{5\ b,3}$	$3.28 \pm 0.32 \times 10^{5\ b,3}$
T12	$3.37 \pm 0.21 \times 10^{3\ c,1}$	$3.20 \pm 0.62 \times 10^{3\ e,1}$	$1.60 \pm 0.10 \times 10^{3\ f,2}$	$1.60 \pm 0.22 \times 10^{3\ f,2}$	$3.22 \pm 0.13 \times 10^{3\ d,1}$	$3.10 \pm 0.13 \times 10^{3\ d,1}$	$3.27 \pm 0.38 \times 10^{3\ d,1}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T2: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T3: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T4: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T5: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, T6: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T7: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T8: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T9: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T10: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T11: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส), T12: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

2.4 ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria ในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม พบว่าในทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria ตั้งแต่วันแรกของการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria ในหมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Psychrotrophic bacteria (CFU/g)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T1	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T2	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T3	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T4	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T5	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T6	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T7	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T8	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T9	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T10	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T11	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$
T12	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$	$< 10^{2\ a,1}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T2: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T3: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T4: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T5: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T6: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส,
T7: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T8: หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T9: หมึกบดอบเนย เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T10: หมึกบดอบเนย ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T11: หมึกบดในน้ำเชื่อม เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส),
T12: หมึกบดในน้ำเชื่อม ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิห้อง (~30 ± 2 องศาเซลเซียส)

3. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลท และสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *Bacillus* (10 ไอโซเลท) และ Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae (4 ไอโซเลท) เท่านั้น โดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. macquariensis*, *B. licheniformis*, *B. acidocaldarius*, *B. pasteurii*, และ *B. licheniformis* ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Kocuria kristinae*, *Staphylococcus lutrae*, *S. hyicus* และ S. *intermidius* ดังแสดงในตารางที่ 10-12

ตารางที่ 10 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเบื้องต้น

ไอโซเลท	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์			Catalase test	คาดว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม
			รูปร่าง	แกรม	สปอร์		
1	PCA	กลม ขอบหยัก ผิวหน้าแห้งเรียบ ขนาดเล็ก สีขาว	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
2	PCA	กลม ขอบหยัก ผิวหน้ากำมะหยี่ ขนาดกลาง สีเทาขาว	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
3	PCA	กลม ขอบหยัก ผิวหน้ามันย่น ขนาดกลาง สีเทาใส	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
4	PCA	กลม ขอบหยัก ผิวหน้ามันเรียบ ขนาดกลาง สีเทาขาว	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
5	PCA	กลม ขอบหยักมาก ผิวหน้ามันย่นนูน ขนาดกลาง สีเทา	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
6	PCA	กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามัน ขนาดเล็ก สีเหลือง	กลม	+	-	+	Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae
7	PCA	กลม ขอบเรียบ ผิวหน้าแห้ง ขนาดเล็ก สีเหลือง	กลม	+	-	+	Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae
8	PCA	กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามัน ขนาดเล็ก สีขาว	กลม	+	-	+	Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae
9	PCA	กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามัน ขนาดเล็ก สีครีม	กลม	+	-	+	Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae
10	Bacillus Medium	กลมแผ่ ขอบหยัก ผิวหน้าแห้งเรียบ ขนาดใหญ่ สีขาว	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
11	Bacillus Medium	กลมแผ่ ขอบหยัก ผิวหน้ากำมะหยี่ ขนาดใหญ่ สีขาว	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
12	Bacillus Medium	กลมแผ่ ขอบหยัก ผิวหน้ามันย่นนูน ขนาดกลาง สีเทาใส	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
13	Bacillus Medium	กลมแผ่ ขอบหยัก ผิวหน้าแห้งย่นนูน ขนาดกลาง สีขาว	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*
14	Bacillus Medium	กลม ขอบหยักมาก ผิวหน้ามันนูน ขนาดใหญ่ สีเทา	ท่อน	+	+	+	*Bacillus*

หมายเหตุ: แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus*) ต่อตารางที่ 11 และแบคทีเรียกลุ่ม Micrococcaceae/Streptococcaceae ต่อตารางที่ 12

ตารางที่ 11 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus*)

ไอโซเลท	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี																	คาดว่าเป็นแบคทีเรียชนิด
	Anaerobic growth	VP test	Acid from D-xlucose	Acid from D-glucose	Gas from glucose	Hydrolysis of Starch	Hydrolysis of Gelatin	Growth in 2 % NaCl	Growth in 5 % NaCl	Growth in 7 % NaCl	Growth in 10 % NaCl	Growth at 10 °C	Growth at 30 °C	Growth at 40 °C	Growth at 65 °C	Nitrate reduction test	Citrate utilization test	
1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	N	+	-	+	+	*Bacillus subtilis*
2	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	N	+	-	+	-	*B. circulans*
3	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	N	+	-	+	+	*B. subtilis*
4	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	*B. macquariensis*
5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	N	+	-	+	+	*B. licheniformis*
10	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	N	+	-	+	+	*B. subtilis*
11	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	N	+	+	+	-	*B. acidocaldarius*
12	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	N	+	-	+	+	*B. pasteurii*
13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	N	+	-	+	+	*B. licheniformis*
14	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	N	+	-	+	+	*B. subtilis*

หมายเหตุ: N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 12 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่ม Micrococcaceae/Staphylococcaceae

ไอโซเลท	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี																	คาดว่าเป็นแบคทีเรียชนิด
	Coagulase test	OF-glucose	Lysine decarboxylase test	Lysine deaminase test	Indole production test	Bile esculin	Urease test	VP test	Nitrate reduction test	Arginin	Gelatin	Acid from Maltose	Acid from Glucose	Acid from Xylose	Acid from mannose	Acid from Sucose	Acid from Manital	
6	-	-	N	N	-	N	+	N	N	N	-	N	+	N	+	N	N	*Kocuria kristinae*
7	+	N	N	N	N	N	+	N	+	N	N	+	N	+	N	N	N	*Staphylococcus lutrae*
8	+	-	N	N	N	N	-	N	+	N	N	-	+	-	+	+	-	*S. hyicus*
9	+	N	N	N	N	N	+	N	+	N	N	+	+	+	+	+	-	*S. intermidius*

หมายเหตุ: N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

4. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส

4.1 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสชนิดเข้มข้น

จากการทดลองผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส โดยใช้การระเหย สารที่ได้มีลักษณะภายนอกค่อนข้างไม่แตกต่างจากเดิม คือ มีลักษณะข้นขึ้นเล็กน้อยและมีสีอ่อนจากเดิมเล็กน้อย ส่วนใสที่ได้นำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

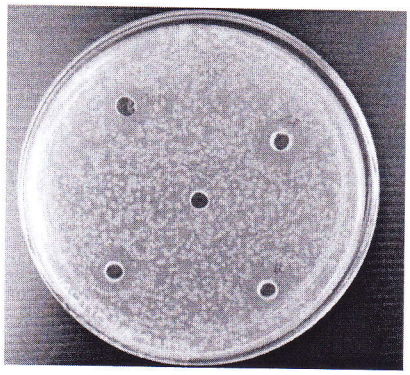
4.2 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์

4.2.1 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

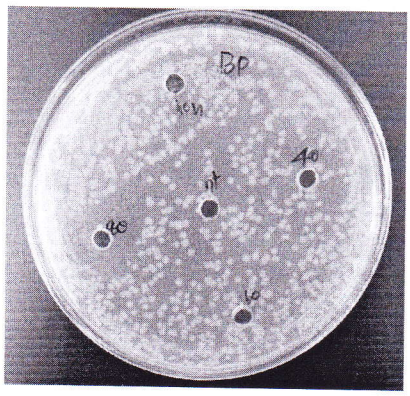
ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสซึ่งได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 20%, 40%, 60% และ 80% ตามลำดับ พบว่ามีการตกตะกอนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส และความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่สามารถตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณมากที่สุด คือความอิ่มตัวที่ 80% สามารถตกตะกอนโปรตีนอยู่ในช่วง 0.160-0.229 กรัม จากนั้นนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่ตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาทดลองหาความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบสูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 13

4.2.2 การศึกษาหาความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์

ความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus subtillis* คือ 40% $(NH_4)_2SO_4$ ส่วนแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *B. polymyxa*, *B. thurigiensis* และ *B. megaterium* ความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอนคือ 80% $(NH_4)_2SO_4$ และความอิ่มตัวที่เหมาะสมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *B. licheniformis* คือ 60% $(NH_4)_2SO_4$ ดังแสดงในตารางที่ 14

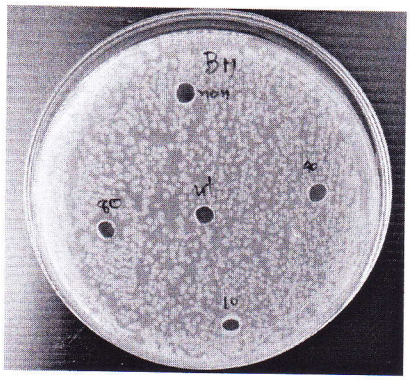


ภาพที่ 1 บริเวณยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtillis*

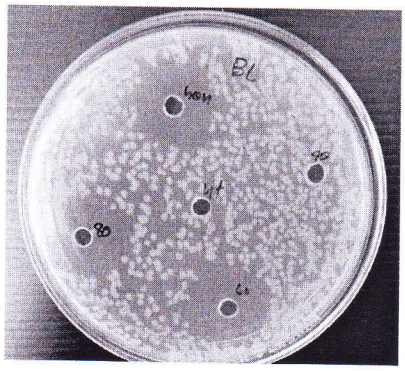


ภาพที่ 2 บริเวณยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. polymyxa*

ภาพที่ 3 บริเวณยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. thurigiensis*



ภาพที่ 4 บริเวณยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. megaterium*



ภาพที่ 5 บริเวณยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. licheniformis*

ตารางที่ 13 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนได้ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีช่วงความอิ่มตัวแตกต่างกัน

สายพันธุ์	ช่วง % ความอิ่มตัวของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนได้ (g)	ความเข้มข้นของสารสะลาย (g/L)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(wt/v)
B. subtillis	0-20	0.096	3.84	0.384
	20-40	0.126	5.04	0.504
	40-60	0.132	5.28	0.528
	60-80	0.204	8.16	0.816
B. polymyxa	0-20	ไม่ตกตะกอน	-	-
	20-40	0.131	5.24	0.524
	40-60	0.108	4.32	0.432
	60-80	0.160	6.40	0.640
B. thurigiensis	0-20	ไม่ตกตะกอน	-	-
	20-40	0.153	6.12	0.612
	40-60	0.133	5.32	0.532
	60-80	0.169	6.76	0.676
B. megaterium	0-20	ไม่ตกตะกอน	-	-
	20-40	ไม่ตกตะกอน	-	-
	40-60	0.151	6.04	0.604
	60-80	0.166	6.64	0.664
B. licheniformis	0-20	ไม่ตกตะกอน	-	-
	20-40	ไม่ตกตะกอน	-	-
	40-60	0.207	8.28	0.828
	60-80	0.229	9.16	0.916

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวแตกต่างกัน ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	20% $(NH_4)_2SO_4$	40% $(NH_4)_2SO_4$	60% $(NH_4)_2SO_4$	80% $(NH_4)_2SO_4$
B. subtillis	0.00 ± 0.00	11.50 ± 0.50	10.90 ± 2.25	11.20 ± 18.02
B. polymyxa	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.20 ± 0.21	21.10 ± 0.93
B. thurigiensis	0.00 ± 0.00	16.35 ± 0.45	17.15 ± 0.21	23.25 ± 1.77
B. megaterium	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	7.95 ± 0.35
B. licheniformis	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	22.60 ± 0.71	21.10 ± 0.93

5. การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในการควบคุมจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

5.1 การประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

จากการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างหมึกแปรรูป ชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมาก (ภาพที่ 6) ที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี พบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกแปรรูปชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมาก โดยมีปริมาณเท่ากับ $3.60 \pm 1.07 \times 10^5$ CFU/g เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบดังนี้คือ *Bacillus coagulans*, *B. pasteurii*, *B. badius*, *B. laterosporus* และ *B. schlegelii* นอกจากนี้ยังตรวจพบราและยีสต์ในปริมาณเท่ากับ $1.67 \pm 1.15 \times 10^3$ CFU/g แต่จากการทดลองครั้งนี้ตรวจไม่พบแบคทีเรียกลุ่มชอบความเย็น แบคทีเรียกลุ่มผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* แบคทีเรียกลุ่มผลิตฮิสตามีน และ *Salmonella* spp. ดังแสดงในตารางที่ 15

ภาพที่ 6 หมึกแปรรูปชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมากที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี (ภาพโดย น้ำผึ้ง บุตรโคตร)

ตารางที่ 15 คุณภาพทางจุลชีววิทยาของหมึกแปรรูป ชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมากที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)
แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด	$3.60 \pm 1.07 \times 10^5$
แบคทีเรียกลุ่มชอบความเย็น	ไม่พบ
แบคทีเรียกลุ่มผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	ไม่พบ
แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*	ไม่พบ
แบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *E. coli*	< 3 MPN/g
แบคทีเรียกลุ่มผลิตฮิสตามีน	ไม่พบ
Staphylococcus aureus	< 3 MPN/g
Salmonella spp.	ไม่พบ
ราและยีสต์	$1.67 \pm 1.15 \times 10^3$

ตารางที่ 16 ชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในหมึกแปรรูป ชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมากที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี

ไอโซเลท	ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)
T1	*Bacillus coagulans*	$1.54 \pm 1.01 \times 10^5$
T2	*Bacillus pasteurii*	$5.40 \pm 4.09 \times 10^4$
T3	*Bacillus laterosporus*	$1.00 \pm 0.00 \times 10^4$
T4	*Bacillus badius*	$7.60 \pm 2.60 \times 10^4$
T5	*Bacillus schlegelii*	$4.25 \pm 2.22 \times 10^4$

ตารางที่ 17 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในหมึกแปรรูป ชนิดหมึกแห้งบดเผ็ดน้อยแห้งมากที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี

ไอโซเลท	ชนิดของแบคทีเรีย	Gram	shape	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี									
				Endospore-f0rming	catalase	Anaerobic growth	VP test	Nitrate reduction	Acid from D-Xylose	Hydrolysis of Gelatin	Hydrolysis of Starch	Growth in NaCl 7%	Growth at 40°C
T1	*B. coagulans*	Positive	Rod	✓	+	+	+	+	-	-	N	N	N
T2	*B. pasteurii*	Positive	Rod	✓	+	+	-	N	-	N	-	+	N
T3	*B. laterosporus*	Positive	Rod	✓	+	+	-	N	-	N	-	-	N
T4	*B. badius*	Positive	Rod	✓	+	-	-	+	N	-	-	N	+
T5	*B. schlegelii*	Positive	Rod	✓	+	-	-	+	N	-	-	N	-

หมายเหตุ: N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

5.2 การออกแบบการทดลองของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบแบคทีเรียกลุ่มเดียวคือ แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่านั้น ดังนั้นในการศึกษาต่อเนื่องจึงทำการศึกษาถึงการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวต่อไป

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของส่วนใสเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $5.18\pm0.98\times10^{5}$ ถึง $7.65\pm0.63\times10^{5}$ CFU/g ในวันแรกของการทดลอง และพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกชุดการทดลองที่มีการเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของส่วนใสเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ (T1-T5) โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง $2.84\pm0.43\times10^{5}$ ถึง $4.49\pm0.53\times10^{5}$ CFU/g (ดังแสดงในตารางที่ 18) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง 23.19-62.88% (ตารางที่ 19) ซึ่งผลการทดลองมีแนวโน้มเหมือนกับชุดการทดลองที่เติมไนซินและกรดแลคติกที่ระยะในระยะเวลาที่นานขึ้น ปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 27.75% และ 32.10% ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 14 และ 28 วันตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองที่เติมสารผสมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของส่วนใสเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ (T6: MixC) ที่พบว่าปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น

ตารางที่ 18 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปเมื่อเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปส่วนใสเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสชนิดต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T1: CBL	$6.73\pm0.22\times10^{5\ d,3}$	$4.88\pm1.11\times10^{5\ d,2}$	$3.70\pm0.78\times10^{5\ a,2}$	$3.46\pm1.08\times10^{5\ abc,1}$	$3.42\pm0.84\times10^{5\ a,1}$	$2.98\pm0.40\times10^{5\ a,1}$
T2: CBM	$7.30\pm0.83\times10^{5\ d,4}$	$3.69\pm0.55\times10^{5\ c,12}$	$4.74\pm0.86\times10^{5\ b,3}$	$3.70\pm0.64\times10^{5\ abc,2}$	$4.43\pm0.97\times10^{5\ ab,23}$	$3.34\pm0.67\times10^{5\ a,1}$
T3: CBS	$5.18\pm0.98\times10^{5\ c,2}$	$5.33\pm1.12\times10^{5\ d,2}$	$6.97\pm0.99\times10^{5\ d,3}$	$3.18\pm0.68\times10^{5\ ab,1}$	$3.56\pm1.28\times10^{5\ a,1}$	$3.05\pm0.62\times10^{5\ a,1}$
T4: CBP	$7.65\pm0.63\times10^{5\ d,3}$	$3.35\pm0.28\times10^{5\ bc,12}$	$3.80\pm0.74\times10^{5\ a,2}$	$3.10\pm0.54\times10^{5\ ab,12}$	$3.50\pm0.64\times10^{5\ a,12}$	$2.84\pm0.43\times10^{5\ a,1}$
T5: CBT	$6.90\pm1.50\times10^{5\ d,2}$	$4.97\pm0.86\times10^{5\ d,1}$	$5.30\pm1.46\times10^{5\ bc,1}$	$4.42\pm1.29\times10^{5\ c,1}$	$5.06\pm1.10\times10^{5\ bc,1}$	$4.49\pm0.53\times10^{5\ b,1}$
T6: MixC	$3.18\pm0.53\times10^{5\ a,12}$	$2.83\pm0.61\times10^{5\ ab,1}$	$3.51\pm0.60\times10^{5\ a,123}$	$4.17\pm1.17\times10^{5\ bc,23}$	$4.39\pm1.26\times10^{5\ ab,3}$	$3.54\pm0.99\times10^{5\ a,123}$
C1: Nisin	$3.46\pm0.52\times10^{5\ ab,2}$	$3.40\pm0.60\times10^{5\ bc,12}$	$3.28\pm0.49\times10^{5\ a,12}$	$2.50\pm0.42\times10^{5\ a,1}$	$3.86\pm1.09\times10^{5\ ab,2}$	$3.32\pm0.59\times10^{5\ a,12}$
C2: Lactic acid	$6.48\pm0.94\times10^{5\ d,3}$	$2.56\pm0.32\times10^{5\ a,1}$	$5.93\pm1.15\times10^{5\ cd,3}$	$3.58\pm0.92\times10^{5\ abc,12}$	$6.42\pm1.50\times10^{5\ d,3}$	$4.40\pm0.91\times10^{5\ b,2}$
C3: น้ำกลั่น	$4.53\pm1.07\times10^{5\ bc,2}$	$2.68\pm0.63\times10^{5\ a,1}$	$4.93\pm0.70\times10^{5\ bc,23}$	$6.45\pm1.37\times10^{5\ d,4}$	$6.02\pm0.50\times10^{5\ cd,34}$	$5.70\pm0.66\times10^{5\ c,234}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T1: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น
T2: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. megaterium* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น
T3: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtillis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น
T4: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. polymyxa* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น
T5: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. thurigiensis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น
T6: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ในรูปของส่วนใสเข้มข้น
C1: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารละลายไนซินความเข้มข้น 1000 IU/ml
C2: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์
C3: หมึกแปรรูปเติมด้วยน้ำกลั่น

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อวันที่ 0 ในชุดที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปส่วนใสเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสชนิดต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T1: CBL	27.49	45.02	48.59	49.18	55.72
T2: CBM	49.45	38.77	49.32	39.32	54.25
T3: CBS	+2.90*	+34.56*	38.61	31.27	41.12
T4: CBP	56.21	50.33	59.48	54.25	62.88
T5: CBT	27.97	23.19	35.94	26.67	34.93
T6: MixC	11.01	+10.38*	+31.13*	+38.05*	+11.32*
C1: Nisin	1.73	5.20	27.75	+11.56*	4.05
C2: Lactic acid	60.49	8.49	44.75	0.93	32.10
C3: น้ำกลั่น	40.84	+8.83*	+42.38*	+32.89*	+25.83*

หมายเหตุ: เครื่องหมาย (+*) แสดงเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อวันที่ 0

T1: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น

T2: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. megaterium* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น

T3: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtillis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น

T4: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. polymyxa* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น

T5: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. thurigiensis* ในรูปของส่วนใสเข้มข้น

T6: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ในรูปของส่วนใสเข้มข้น

C1: หมักแปรรูปเติมด้วยสารละลายไนซินความเข้มข้น 1000 IU/ml

C2: หมักแปรรูปเติมด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

C3: หมักแปรรูปเติมด้วยน้ำกลั่น

สำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์กับสารเคมีสังเคราะห์ คือ กรดแลคติก และผลิตภัณฑ์แบคเทอริโอซินทางการค้า คือ ไนซิน ในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ (T7-T11) และชุดที่มีการเติมสารผสมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ (T12) ไม่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้ โดยพบว่าในวันแรกของการทดลอง (วันที่ 0) และวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 28) มีปริมาณแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังแสดงในตารางที่ 20) ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมสารเคมีสังเคราะห์ไนซินและกรดแลคติก พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงมีค่าเท่ากับ 70.36% และ 30.70% ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 21)

ตารางที่ 20 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างหมึกแห้งเมื่อเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสชนิดต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)					
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T7: PBL	$2.35\pm0.90\times10^{5\ a,1}$	$2.70\pm0.89\times10^{5\ abc,1}$	$2.41\pm0.62\times10^{5\ ab,1}$	$2.48\pm0.75\times10^{5\ a,1}$	$2.43\pm0.53\times10^{5\ ab,1}$	$2.63\pm0.64\times10^{5\ b,1}$
T8: PBM	$2.70\pm0.83\times10^{5\ ab,1}$	$3.11\pm0.74\times10^{5\ abc,1}$	$3.06\pm0.80\times10^{5\ bc,1}$	$2.41\pm0.77\times10^{5\ a,1}$	$3.08\pm0.55\times10^{5\ bcd,1}$	$2.83\pm0.27\times10^{5\ b,1}$
T9: PBS	$3.17\pm0.44\times10^{5\ abc,1}$	$3.34\pm0.80\times10^{5\ cd,12}$	$3.77\pm0.68\times10^{5\ cd,12}$	$4.23\pm0.23\times10^{5\ c,23}$	$5.03\pm0.23\times10^{5\ e,3}$	$4.27\pm0.78\times10^{5\ c,23}$
T10: PBP	$3.20\pm0.63\times10^{5\ bc,1}$	$2.81\pm0.57\times10^{5\ abc,1}$	$3.15\pm0.54\times10^{5\ bc,1}$	$4.20\pm0.74\times10^{5\ c,2}$	$3.23\pm0.83\times10^{5\ cd,1}$	$2.64\pm0.69\times10^{5\ b,1}$
T11: PBT	$3.29\pm0.66\times10^{5\ bc,2}$	$2.43\pm0.65\times10^{5\ ab,1}$	$3.11\pm0.42\times10^{5\ bc,1}$	$2.58\pm0.58\times10^{5\ a,1}$	$3.26\pm0.79\times10^{5\ cd,2}$	$3.34\pm0.51\times10^{5\ b,2}$
T12: MixP	$3.43\pm0.74\times10^{5\ bc,1}$	$3.15\pm0.72\times10^{5\ bc,1}$	$2.97\pm0.78\times10^{5\ b,1}$	$3.13\pm0.75\times10^{5\ ab,1}$	$2.90\pm0.47\times10^{5\ abc,1}$	$2.98\pm0.71\times10^{5\ b,1}$
C4: Nisin	$3.07\pm0.76\times10^{5\ abc,3}$	$2.27\pm0.59\times10^{5\ a,2}$	$1.72\pm0.50\times10^{5\ a,2}$	$3.27\pm0.77\times10^{5\ ab,3}$	$2.15\pm0.58\times10^{5\ a,2}$	$0.91\pm0.17\times10^{5\ a,1}$
C5: Lactic acid	$4.30\pm0.59\times10^{5\ d,2}$	$4.13\pm0.73\times10^{5\ d,2}$	$4.41\pm0.84\times10^{5\ d,2}$	$4.00\pm0.86\times10^{5\ bc,2}$	$3.79\pm0.80\times10^{5\ d,2}$	$2.98\pm0.64\times10^{5\ b,1}$
C6: น้ำกลั่น	$3.80\pm0.75\times10^{5\ cd,2}$	$3.50\pm0.96\times10^{5\ cd,12}$	$3.15\pm0.66\times10^{5\ d,12}$	$3.53\pm0.75\times10^{5\ bc,12}$	$2.70\pm0.55\times10^{5\ abc,1}$	$3.00\pm0.58\times10^{5\ b,12}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
T7: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์
T8: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. megaterium* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์
T9: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtillis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์
T10: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. polymyxa* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์
T11: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. thurigiensis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์
T12: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์
C4: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารละลายไนซินความเข้มข้น 1000 IU/ml
C5: หมึกแปรรูปเติมด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์
C6: หมึกแปรรูปเติมด้วยน้ำกลั่น

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อวันที่ 0 ในชุดที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสชนิดต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
T7: PBL	+14.89*	+2.55*	+5.53*	+3.40*	+11.91*
T8: PBM	+15.19*	+13.33*	10.74	+14.07*	+4.81*
T9: PBS	+5.36*	+18.93*	+33.44*	+58.68*	+34.70*
T10: PBP	12.19	1.56	+31.25*	+0.94*	17.50
T11: PBT	26.14	5.47	21.58	0.91	+1.52*
T12: MixP	8.16	13.41	8.75	15.45	13.12
C4: Nisin	26.06	43.97	+6.51*	29.97	70.36
C5: Lactic acid	3.95	+2.56*	6.98	11.86	30.70
C6: น้ำกลั่น	7.89	17.11	7.11	28.95	21.05

หมายเหตุ: เครื่องหมาย (+*) แสดงเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อวันที่ 0

T7: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์

T8: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. megaterium* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์

T9: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtillis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์

T10: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. polymyxa* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์

T11: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. thurigiensis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์

T12: หมักแปรรูปเติมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์

C4: หมักแปรรูปเติมด้วยสารละลายไนซินความเข้มข้น 1000 IU/ml

C5: หมักแปรรูปเติมด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

C6: หมักแปรรูปเติมด้วยน้ำกลั่น

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนยและหมึกบดในน้ำเชื่อม พบว่าหมึกบดอบเนยมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง $5.48 \pm 0.88 \times 10^5$ - $7.10 \pm 0.58 \times 10^5$ CFU/g รองลงมาคือ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมากมีปริมาณอยู่ในช่วง $1.45 \pm 0.19 \times 10^3$ - $1.83 \pm 0.54 \times 10^3$ CFU/g และหมึกบดในน้ำเชื่อมมีปริมาณอยู่ในช่วง $1.45 \pm 0.13 \times 10^3$ - $2.23 \pm 0.45 \times 10^3$ CFU/g ตามลำดับ จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม พบแบคทีเรียทั้งหมด 14 ไอโซเลท และสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *Bacillus* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. macquariensis*, *B. licheniformis*, *B. acidocaldarius*, *B. pasteurii*, และ *B. licheniformis* และ Micrococcaceae/Staphyloccoccaceae จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Kocuria kristinae*, *Staphylococcus lutrae*, *S. hyicus* และ *S. intermidius* ต่อมาทำการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสประมาณ 10^8 CFU/mL ที่เติมในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม ที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่าง 4 องศาเซลเซียส และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และพบการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกสูงสุดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปชนิดหมึกบดอบเนยที่เติมโพรไบโอติก (T3) โดยสามารถตรวจพบปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium เท่ากับ $5.27 \pm 0.49 \times 10^6$ และ $3.34 \pm 0.45 \times 10^6$ CFU/g ตามลำดับ และผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในผลิตภัณฑ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้คือ สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปของส่วนใสเข้มข้นมีความสามารถในการลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกแปรรูปได้ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส รวมทั้งชุดที่มีการเติมสารผสมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้นพบปริมาณแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อภิปรายผลการทดลอง

การมีชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกเป็นสิ่งที่สำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ (FAO/WHO, 2001) ดังนั้นการรักษาโพรไบโอติกให้มีชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับผู้ผลิตอาหารที่มีการเติมโพรไบโอติก โดยผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม ซึ่งการศึกษาทางด้านคลินิกวิทยาที่ผ่านมาพบว่าโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์ แต่ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกที่นอกเหนือจากผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนม ส่งผลให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกในกลุ่มของอาหารที่ไม่ทำมาจากนมและอาหารแห้ง (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010) อย่างไรก็ตามการเติมโพรไบโอติกในอาหารรูปแบบใหม่ และการรักษาโพรไบโอติกให้ยังคงมีชีวิตอยู่ในช่วงอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการลดจำนวนโพรไบโอติก ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณก๊าซออกซิเจน ความชื้น ปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ ความเป็นกรด-ด่าง และการมีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สามารถลดปริมาณโพรไบโอติกที่มีชีวิตลงได้ (Vesterlund et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการเก็บรักษา อุณหภูมิ และปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ต่อการเก็บรักษาแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม เพื่อใช้เป็นรูปแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกต่อไป

1. ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อยู่ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าในวันแรกของการทดลองผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง $1.28 \pm 0.19 \times 10^{8}$ - $2.15 \pm 0.54 \times 10^{8}$ CFU/g และ $1.12 \pm 0.49 \times 10^{8}$ - $1.60 \pm 0.26 \times 10^{8}$ CFU/g ตามลำดับ โดยหลังจากที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน ตรวจพบปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium อยู่ในช่วง $2.23 \pm 0.25 \times 10^{5}$ - $5.27 \pm 0.48 \times 10^{6}$ CFU/g และ $2.16 \pm 0.24 \times 10^{5}$ - $3.34 \pm 0.45 \times 10^{6}$ CFU/g ตามลำดับ โดยพบว่าผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปชนิดหมึกอบเนยมีการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกสูงสุด ซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium เท่ากับ $5.27 \pm 0.49 \times 10^{6}$ และ $3.34 \pm 0.45 \times 10^{6}$ CFU/g ตามลำดับ นอกจากนั้นในชุดการทดลองผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน สามารถตรวจพบปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium อยู่ในช่วง $2.75 \pm 0.26 \times 10^{5}$ - $6.32 \pm 0.42 \times 10^{5}$ CFU/g และ $2.40 \pm 0.25 \times 10^{5}$ - $5.35 \pm 0.64 \times 10^{5}$ CFU/g ตามลำดับ

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในชะลอการลดลงของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารสูงกว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยปัจจัยด้านอุณหภูมิที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ มักเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum temperature) ต่อการเจริญ ช่วงของอุณหภูมิสูงสุด (Maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด (Minimum temperature) ที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2548)

โดยจากการศึกษาพบว่า *Bacillus* spp. มีระยะเวลาในการแบ่งตัว (Generation time) ที่อุณหภูมิ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็น 23, 8.5, 6.0, 3.0, 2.5 และ 2.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546) จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิยิ่งต่ำลงระยะเวลาในการแบ่งตัวจะนานขึ้น จุลินทรีย์จะสามารถเจริญในอาหารได้เพียงระดับหนึ่งก่อนจะเข้าสู่ระยะที่มีการลดลงของจุลินทรีย์ (Death phase) เนื่องจากสารอาหารที่เหมาะสมมีปริมาณที่จำกัด และเกิดความเป็นพิษของสารเมแทบอไลต์ (Metabolites) ที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ (นิอร โฉมศรี, 2555) นอกจากนี้ในอาหารยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อลดลงของจุลินทรีย์ เช่น ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ เช่น เครื่องเทศที่ใช้ในการปรุงอาหาร โดยในพืชเครื่องเทศจะมีน้ำมันหอมระเหยที่สะสมอยู่ในเซลล์ สารประเภทนี้จะมีกลิ่นหอม และส่วนมากมีโครงสร้างของสารประกอบประเภทเทอร์ปีนส์ (Terpenes) และสารประกอบอะโรมาติกฟีนอล เช่น ยูกินอล (Eugenol) ที่มีสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์แบบไม่จำกัดชนิด (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกบดอบเนยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สูงกว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต่ำกว่า และจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก และหมึกบดในน้ำเชื่อมมีการใช้เครื่องเทศในการปรุงรสที่มากกว่าในผลิตภัณฑ์หมึกบดอบเนย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเครื่องเทศที่เป็นส่วนผสมในหมึกแปรรูปไปทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมลงในผลิตภัณฑ์

แต่จากผลการทดลองที่แสดงให้เห็นถึงผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบการลดลงของปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 28 วัน ทั้งนี้มีสาเหตุจากอุณหภูมิที่ต่ำสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้บางส่วน โดยเกิดการตกตะกอนหรือสูญเสียสภาพของโปรตีน และเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของตัวทำละลายในน้ำส่วนที่ไม่แข็งตัว และการเกิดผลึกน้ำแข็งทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายและแตกได้เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ (นิอร โฉมศรี, 2555) นอกจากนี้การแช่เย็นแบบเร็ว (Rapid cooling) ส่งผลให้จุลินทรีย์ได้รับความเย็นอย่างรวดเร็วทำให้เกิดสภาวะ Cold shock และเกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูพรุน (Hydrophilic pores) เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบเซลล์ และยังส่งผลให้เกิดการฉีกขาดของสาย DNA ทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บและตายได้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนย และหมึกบดในน้ำเชื่อม ที่วางจำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี พบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกบดอบเนยมีปริมาณอยู่ในช่วง $5.48 \pm 0.88 \times 10^5$ - $7.10 \pm 0.58 \times 10^5$ CFU/g รองลงมาคือหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมากและหมึกบดในน้ำเชื่อม ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง $1.45 \pm 0.19 \times 10^3$ - $1.83 \pm 0.54 \times 10^3$ CFU/g และ $1.45 \pm 0.13 \times 10^3$ - $2.23 \pm 0.45 \times 10^3$ CFU/g ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ข) ที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในอาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโร-โทรปทั้งหมดอยู่ในช่วง $6.00 \pm 2.00 \times 10^2$ ถึง $4.40 \pm 1.22 \times 10^9$ CFU/g อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานของ ศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์ (2550) ที่ได้ทำการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของหมึกแห้งปรุงรส พบว่าหมึกบดอบกรอบมีจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 2.0×10^6 CFU/g และพบราเฉลี่ย 1.2×10^2 CFU/g ส่วนหมึกบดอบชนิดไม่เผ็ดมีจุลินทรีย์เฉลี่ย 1.4×10^7 CFU/g และพบราเฉลี่ย 2.1×10^2 CFU/g และหมึกบดอบชนิดเผ็ดมีจุลินทรีย์เฉลี่ย 6.0×10^6 CFU/g และมีราเฉลี่ย 1.3×10^2 CFU/g โดยทุกตัวอย่างมี *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g

มาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์ของหมึกปรุงรสกำหนดให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดที่ตรวจพบในหมึกปรุงรสมีค่าไม่เกิน 1×10^4 CFU/g ซึ่งต้องมีปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม *E. coli* น้อยกว่า 3 CFU/g ยีสต์และราไม่เกิน 10^2 CFU/g (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547) จากการศึกษาในครั้งนี้ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปหมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมากและหมึกบดในน้ำเชื่อมผ่านมาตรฐานเนื่องจากมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10^4 CFU/g แต่พบว่าหมึกบดอบเนยไม่ผ่านมาตรฐานเนื่องจากมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินค่ามาตรฐาน ซึ่งจากการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารแห้งนั้น ถือว่าเป็นสิ่งที่สำคัญต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังสามารถบ่งบอกถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย โดยหากผู้บริโภคได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคในปริมาณที่สูงเกินมาตรฐานกำหนดก็จะเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้เจ็บป่วย และเสียชีวิตได้ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2554)

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทะเลอาจมีสาเหตุการปนเปื้อนมาจากแหล่งน้ำที่สัตว์ทะเลที่นำมาบริโภคหรือแปรรูปเป็นอาหารอาศัยอยู่ โดยจุลินทรีย์สามารถปนเปื้อนอยู่ในบริเวณทางเดินอาหาร เหงือก และผิวหนังของสัตว์น้ำ ซึ่งพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 10^3-10^8 CFU/g นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ก็ส่งผลต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น เครื่องมือในการจับสัตว์น้ำ วิธีในการเก็บสัตว์น้ำ ภาชนะบรรจุสัตว์น้ำ น้ำแข็งที่ใช้ในการแช่เย็น น้ำที่ใช้ในการล้าง ชาวประมงที่ทำหน้าที่จับสัตว์น้ำ ผู้จำหน่ายสัตว์น้ำ ตลอดจนกระบวนการในการแปรรูปอาหารจากสัตว์น้ำ (นิอร โฉมศรี, 2555) โดยในกระบวนการแปรรูปมักพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทะเลซึ่งเกี่ยวข้องกับผู้ประกอบอาหาร และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูป ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปสามารถผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่มีการควบคุมการผลิตที่ได้มาตรฐาน และผลิตจากอุตสาหกรรมขนาดเล็กหรือในครัวเรือนที่อาจมีการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป

ได้ จุลินทรีย์ที่มักพบในการปนเปื้อน ได้แก่ *Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Pseudomonas, Enterobacter* และ *E. coli* ดังนั้นในกระบวนการแปรรูปอาหาร ผู้ผลิตต้องมีความรู้ด้านสุขาภิบาลอาหาร เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหาร (รังสินี โสธรวิทย์, 2553; ศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์, 2550)

3. ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในผลิตภัณฑ์

จุลินทรีย์ต้องการน้ำอิสระเพื่อใช้ในการเจริญ และกิจกรรมต่าง ๆ โดยจะใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์รวมทั้งใช้ในการขับของเสียออกนอกเซลล์ และยังเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ (รังสินี โสธรวิทย์, 2553) โดยเมื่อมีปริมาณน้ำอิสระในอาหารเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้อัตราของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (ปราณี มีศิริสุข, 2553) แต่ถ้าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้อยู่ในระดับต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม จะทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำลง (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) ดังนั้นการลดหรือการควบคุมปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (ปราณี มีศิริสุข, 2553) โดยปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในอาหารคือความชื้นสัมพัทธ์ของสภาวะการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากจะมีการถ่ายเทของน้ำระหว่างสภาวะบรรยากาศกับอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ (นิอร โฉมศรี, 2555)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในผลิตภัณฑ์ เมื่อทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าในวันแรกของการทดลองผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมีค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้อยู่ในช่วง 0.4263 ± 0.0051 - 0.5820 ± 0.0056 หลังจากที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่ามีการคงที่ของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.4743 ± 0.0012 - 0.5913 ± 0.0092 และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้อยู่ในช่วง 0.4727 ± 0.0021 - 0.5123 ± 0.0042

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชะลอการลดลงของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็ง เมื่อมีน้ำแข็งเกิดขึ้น ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในน้ำส่วนที่เหลือจะสูงขึ้นจึงทำให้มีปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ต่ำลง (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) แต่จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 เป็นระยะเวลา 28 วัน มีการคงที่ของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากในขั้นตอนการนำตัวอย่างมาทดสอบอาจทำให้เกิดการถ่ายเทของน้ำระหว่างสภาวะบรรยากาศกับอาหาร และอาจเกิดการละลายของน้ำในอาหารที่กลายเป็นน้ำแข็ง

เมื่อมีการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกรูปแบบใหม่ โดยคำนึงถึงความสามารถในการมีชีวิตของโพรไบโอติกเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร สิ่งที่สำคัญคือวัสดุสารของอาหาร สภาวะในกระบวนการผลิตและสภาวะการจัดเก็บ (Grzeskowiak et al., 2011) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมเพื่อรักษาการมีชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสคือการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยพบการลดลงของการมีชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ต่ำกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่ทำให้ปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้ในอาหารเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบอีกว่าการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ Bacillus Medium ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งต่อไปอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจนับมากกว่า เนื่องจากลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มีลักษณะที่ไม่ใหญ่ทำให้สะดวกต่อการนับจำนวนแตกต่างจากลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus Medium จะมีลักษณะโคโลนีที่ใหญ่และแผ่คลุมกันทำให้ยากต่อการนับจำนวน และจากผลการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมีความเป็นไปได้ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดใหม่

4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียปนเปื้อนที่ทำให้อาหารเน่าเสียในตัวอย่างหมึกอบแห้ง

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ซึ่งนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปของส่วนใสเข้มข้นเปรียบเทียบกับกรดแลคติกและไนซิน โดยทำการเก็บรักษาตัวอย่างหมึกแปรรูปในแต่ละชุดการทดลองและตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในวันที่ 0, 1, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง พบว่าในชุดการทดลองที่เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของส่วนใสเข้มข้นจากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัส พบการลดลงของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอ-โรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกแปรรูป เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่เติมกรดแลคติกและไนซิน ที่พบการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกแปรรูปเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 28 วัน ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่น พบมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกแห้งเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกบาซิลลัสในรูปของส่วนใสเข้มข้นมีความสามารถในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างหมึกแปรรูปได้ เนื่องจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพได้หลายชนิด รวมทั้งสารปฏิชีวนะชนิด peptide และ lipopeptide อีกทั้งยังสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดใกล้เคียงกันหรือแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ และเป็นสารที่ผ่านกระบวนสังเคราะห์จากไรโบโซม (Stein, 2005; Abriouel et al., 2011) โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *Bacillus subtillis, B. polymyxa, B. thurigiensis, B. megaterium* และ *B. licheniformis*

มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Stein (2005) พบว่า *Bacillus subtilis* ATCC 6633 สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิด lantibiotics ที่มีชื่อว่า subtilin มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้จากรายงานการวิจัยอื่น ๆ พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* LFB112 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *Salmonella* Pullorum, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus bovis* และ *Staphylococcus aureus* (Xie et al., 2009) จากรายงานการศึกษาของ Piuri et al. (1998) พบว่าสาร Polyxin ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus polymyxa* ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำปลา (Argentinean regional fermented sausages) มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ เช่น *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *E. coli*, *Proteus vulgaris* และ *Klebsiella pneumoniae* ในขณะที่ *Bacillus thuringiensis* สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่รู้จักกันในชื่อ thuricins หรือ entomocins เช่น *B. thuringiensis* B439 ผลิตสาร thuricin B439 (Ahern et al., 2003), thuricin 7 ผลิตได้จาก *B. thuringiensis* BMG1.7 (Cherif et al., 2001), entomocin 9 ผลิตได้จาก *B. thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9 (Cherif et al.,2003) หรือ entomocin 110 ซึ่งผลิตจาก *B. thuringiensis* HD110 (Cherif et al., 2008) โดยสารดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรวมบวกและแกรมลบ เช่น *Bacillus* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Paenibacillus larvae* เป็นต้น (Cherif et al., 2008) สำหรับ *Bacillus megaterium* นั้นสามารถผลิตแบคเทอริโอซินชื่อ megacins ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ A, B และ C ตามกลไกการออกฤทธิ์และกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (Holland and Roberts, 1964) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ZJU12 ที่คัดแยกได้จากดินมีความสามารถในการผลิตสารต้านแบคทีเรียแกรมบวกและราได้ (He et al., 2006)

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2550). *เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไปที่มิใช่อาหารควบคุมเฉพาะกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. วันที่ค้นข้อมูล 5 พฤศจิกายน 2550, เข้าถึงได้จาก http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/varity/cheme/confict22.htm

กรรณิการ์ เสนทอง, สุเมธ เนาว์รุ่งโรจน์, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, ภูวดล บางรักษ์ และวรางคณา จุ้งลก. (2551). *การคัดเลือกและการวิเคราะห์แยกชนิด Bacillus ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อนและ Lactobacillus จากน้ำนมดิบ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

กำเนิด สุภัณวงษ์. (2534). *จุลชีวอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2548). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิอร โฉมศรี. (2555). *จุลชีววิทยาอาหาร*. เชียงใหม่: เชียงใหม่ปรินท์ติ้ง.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. สงขลา: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ปราณี มีศิริสุข. (2553). *เคมีอาหาร*. ชลบุรี: (ม.ป.ท.)

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

พีร์ เหมะรัชตะ. (2551). ความสำคัญของโพรไบโอติกต่อการแพทย์. *วารสารจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*, 52(3), 193-204.

มัทนา แสงจิดาวงษ์. (2538). *จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง*. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

รังสินี โสธรวิทย์. (2550). *เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์วิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสินี โสธรวิทย์. (2553). *เคมีจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไวรุจน์ เดชมหิทกุล, จันทร์จีรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. (2550). การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี*, 30(2), 251-260.

ศิวาพร ศิวเวชช. (2546). *วัตถุเจือปนอาหาร*. นครปฐม: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์. (2550). *คุณภาพทางจุลชีววิทยาของหมึกแห้งปรุงรสพร้อมบริโภคที่จำหน่ายปลีกในตลาดหนองมนชลบุรี*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (หน้า 750-755). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. (2547). *เทคโนโลยีชีวภาพอาหารการหมักและสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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 และสวามินี ธีระวุฒิ. (2554). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2541). *จุลชีววิทยาทางอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: (ม.ป.ท.)

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

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

สำนักงานส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม. (2551). *เครือข่ายวิสาหกิจอุตสาหกรรมอาหารทะเลแปรรูป จังหวัดสมุทรปราการ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี*. วันที่สืบค้นข้อมูล 12 พฤษภาคม 2557, เข้าถึงได้จาก http://www.sme.go.th/SiteCollectionDocuments/14-seafood.pdf

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2545). *รายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำเดือนมีนาคม 2545*. เอกสารอัดสำเนา.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2548). *รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ ประจำปี พ.ศ. 2548: สรุปผลการเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2548*. เข้าถึงได้จาก http://203.157.15.4/publish/outbreak/FPOI49/sur48.htm

เสาวนีย์ ธรรมสถิต. (2547). *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. นครปฐม: สถาบันพัฒนาสาธารณะสุขอาเซียน.

อุทัย เก้าเอี้ยน. (2549). โปรไบโอทิกส์. *วารสารสงขลานครินทร์เวชสาร*, 24(4), 315-323.

อุษามาส จริยวรานุกูล. (2548). การรอดชีวิตของโพรไบโอติกและการนำไปใช้ประโยชน์. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 25(1), 84-93.

Abriouel, H., Franz, C.M., Omar, N.B. and Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*, 35(1), 201-232.

Ahern, M., Verschueren, S. and Sinderen, D. (2003). Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced *by Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS microbiology letters*, 220(1), 127-131.

Amarty, S.A. and Leung, J.P.C. (2000). Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* T-13. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedinia*, 9, 65-71.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. In: A. Mendez-Vilas (Ed.). *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, Vol. 1, pp. 475-486.

Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N. and Gunasekaran, P. (2009). Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, 100, 872-877.

APHA. (1992). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (3th ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

Aycicek, H., Cakiroglu, S. and Stevenson, T.H. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16, 531-534.

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.

Bacteriological Analytical Manual [BAM]. (1998). *US Food and Drugs Administration* (8th ed.). Gaithersburg: AOAC International.

Beuchat, L.R. and Golden, D.A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134–142.

Brink ten, B., Minekns, M., Vander Vossen, J.M.B.M., Leer, R.J. and Huis in't Veld, J.H.J. (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 140-148.

Brul, S., and Coote, P. (1999). Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.

Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A. and Boudabous, A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1. 7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 243-247.

Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Daffonchio, D. and Boudabous, A. (2003). Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 990-1000.

Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D. and Boudabous, A. (2008). Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. *Microbiological Research*, 163(6), 684-692.

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.

Colakoglu, F.J., Sarmasik, A. and Koseoglu, B. (2006). Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles cost of Turkey. *Food Control*, 17, 648-652.

Davidson, P.M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, (Eds). *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: American Society for Microbiology.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *International Journal Antonie Van Leeuwenhoek,* 69, 193-202.

El Enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S. and El Azaly, Y. (2008). Optimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scale. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 583-593.

Emborg, J. and Dalgaard, P. (2006), Formation of histamine and biogenic amines in cold smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *Journal of Food Protection*, 69, 897-906.

FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Retrieved May 12, 2014, from http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf?ua=1

FDA. (1984). *Bacteriological Analytical Manual* (6th ed.). Arlington: VA.

Fisher, K. and Phillips, C.A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232-1240.

Grzeskowiak, L., Isolauri, E., Salminen, S., and Gueimonde, M., (2011). Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *Journal of Nutrition*, 105, 887-894.

Hatha, A.A.M. and Lakshmanaperumalsamy, P. (1997). Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 14, 111–116.

He, L., Chen, W., and Liu, Y. (2006). Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research*, 161(4), 321-326.

Hemalatha, S. and Shanthi, S. (2010). In vitro characterization of bacteriocin producing *Bacillus subtilis* from milk samples. *African Journal of Microbiology Research*, 4(19), 2004-2010.

Holland, I.B., and Roberts, C.F. (1964). Some properties of a new bacteriocin formed by *Bacillus megaterium*. *Journal of general microbiology*, 35(2), 271-285.

Holt, H.M., Gahrn-Hansen, B., and Bruun, B. (2005). *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11, 347–352.

Hosseini, H., Cheraghali, A.M., Yalfani, R., and Razavilar, V. (2004). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control*, 15, 187–190.

Huang, Y.R., Liu, K.J., Hsieh, H.S., Hsieh, C.H., Hwang, D.F. and 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.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Jeya Shakila, 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 Technologies*, 5, 485–493.

Khodair, T.A., Abdelhafez, A.A.M., Sakr, H.M., and Ibrahim, M.M.M. (2008). Improvement of *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticide production by fed-batch culture on low cost effective medium. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (6), 923-935.

Li, H. and O'Sullivan, D.J. (2002). Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3392–3400.

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prevost, F. and Pilet, M.F. (2009a). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, 72, 365-374.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Pre´vost, H., and Leroi, F. (2009b). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 638–644.

Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P. and Vuthiphandchai, V. (2008). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, 285, 123-129.

Niven, C.F., Jeffreg, M.B. and Corlett, D.A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 321-322.

Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N.C., Dambrosio, A., Montag, C. and Chiocco, D. (2006). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 106, 219-222.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.

Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis1, G., Dasiou, D. and Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: Assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories*, 5(30), 1-14.

Parihar, V.S., Barbuddhe, S.B., Danielsson-Tham, M.L., and Tham, W. (2008). Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control*, 19, 566-569.

Piuri, M., Sanchez-Rivas, C. and Ruzal, S.M. (1998). A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Letters in applied microbiology*, 27(1), 9-13.

Rech, R. and Ayub, M.A.Z. (2007). Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochemistry*, 42, 873-877.

Rivera-Espinoza, Y. and Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1-11.

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

Shirazinejad, A.R., Noryati, I., Rosma, A. and Darah, I. (2010). Inhibitory effect of lactic acid and nisin on bacterial spoilage of chilled shrimp. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 65, 163-167.

Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M. and Johnson, E.A. (1998). *Naturally occurring antimicrobials in food: Task force report no.* 132. Ames: Council for Agricultural Science and Technology.

Stein, T., Heinzmann, S., Düsterhus, S., Borchert, S. and Entian, K.D. (2005). Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *Journal of bacteriology*, 187(3), 822-828.

Vesterlund, S., Salminen, K. and Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 319-321.

Xie, J., Zhang, R., Shang, C. and Guo, Y. (2009). Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *African Journal of Biotechnology*, *8*(20).

Yin, L.J., Wu, C.W. and Jiang, S.T. (2007). Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Science*, 73, 907-912.

Yongjin, H., Wenshui, X. and Xiaoyong, L. (2007). Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chemistry,* 104, 188-195.

Zdolec, N., Hadziosmanovic, M., Kozacinski, L., Cvrtila, Z., Filipovic, I., Skrivanko, S. and Leskovar, K. (2008). Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Science*, 80, 480–487.

Output จากโครงการวิจัย

การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับประเทศ

1. Nimrat S, Butkhot N, Sansaneya T, Sangsong J and Vuthiphandchai V. (2014) Effect of Temperature and Storage Duration on Numbers of Total Heterotrophic Bacteria and Psychrotrophic Bacteria in Dried Squid Products. Burapha University International Conference 2014, Dusit Thani Pattaya, Chon Buri, Thailand, July 3-4.
2. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, เทวินทร์ แสนเสนยา, น้ำผึ้ง บุตรโคตร, พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2557). ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารทะเลแห้ง. *ใน* การประชุมวิชาการระดับชาติ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 10: เครือข่ายวิจัยสร้างความรู้สู่อาเซียน, 22-23 กรกฎาคม พ.ศ. 2557, ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.