รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทย

(Development of bioactive compounds from probiotic bacteria for controlling microorganisms, and improving standard and quality of dried seafood products from Thailand)

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802092
สัญญาเลขที่ 81/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทย

(Development of bioactive compounds from probiotic bacteria for controlling microorganisms, and improving standard and quality of dried seafood products from Thailand)

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

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

กันยายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 81/2560 และขอขอบคุณ ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และคุณขวัญฤทัย มาลัยเรือง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้ถังหมักสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเรื่องการพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทย โดยทำการศึกษา 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 คือ การศึกษาขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมักและการเจริญ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ผลการศึกษาพบว่าการศึกษาการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 มีการเติม 1 % (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกในถังหมักมีการเจริญสูงสุดตรวจวัดปริมาณเชื้อได้ $1.15\pm0.01\times10^{12}$ CFU/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง และมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 เท่ากับ 2704.41 Unit/ml รองลงมาคือ เอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16-18 เท่ากับ 3.81 Unit/ml ส่วนเอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด เท่ากับ 1.33 Unit/ml ตลอดระยะเวลาการทดลอง ขั้นตอนที่ 2 คือ ทำการศึกษาถึงผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* (PBL) และสารไนซินเพื่อการเก็บผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปช่วงที่ทำการจำหน่ายภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่ (1) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ (2) การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน ในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ผลการศึกษาพบว่าการเติมสาร PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนเป็นวิธีการเก็บผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปช่วงที่ทำการจำหน่ายได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้ดี (เท่ากับ 44.70%) และสามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ

คำสำคัญ : แบคทีเรียโพรไบโอติก, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง, มาตรฐาน

Abstract

In this study, development of bioactive compounds from probiotic bacteria for controlling microorganisms, and improving standard and quality of dried seafood products from Thailand were studied. There were two steps of experiment. In the first step, the scale-up cultivation of probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* with low-cost substrate in bioreactor in terms of growth and amylase, protease and lipase activities. Results showed that the scale-up cultivation of probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* with low-cost substrate in 5-L stirred bioreactor with rice bran as a substrate, pH 7.0 of cultivated medium, 1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ as nitrogen source, 35 °C, aeration rate 1 vvm, 300 rpm for 24 h. Results demonstrated that the maximum growth of probiotic bacteria in tested bioreactor was $1.15\pm0.01\times10^{12}$ CFU/ml for 16-18 h. The maximum activities of amylase, protease and lipase enzymes were 2704.41 Unit/ml at 18 h of cultivation, 3.81 Unit/ml at 16-18 h and 1.33 Unit/ml throughout the experiment, respectively. In the second phase, the effect of antimicrobial compound in form of partially purified solution produced by *B. licheniformis* (PBL) and nisin for dried squid products preservation during selling under (1) 4 °C and (2) open in daytime and closed in nighttime for controlling total heterotrophic bacteria contaminated in dried squid products was evaluated. Results showed that the addition of PBL every two-week under open in daytime and closed in nighttime conditions is the best preserved technique during selling because of the highest reducing ability of total heterotrophic bacteria (44.70%) and pathogenic bacteria contaminated in dried squid products, compared to the other treatments.

keywords : Bacterial probiotics, Bioactive compounds, Dried seafood products, Standard

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		II
Abstract		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		V
สารบัญภาพ		VI
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	20
4	ผลการทดลอง	26
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง		52
ผลผลิต (Output)		60
ประวัติคณะผู้วิจัย		61

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	12
2	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. lichenifformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร	30
3	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส	31
4	ค่าการดูดกลืนแสงความเข้มข้นของไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	32
5	ค่าการดูดกลืนแสงความเข้มข้นของกรดโอเลอิกและปริมาณ NaOH	33
6	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส	34
7	ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (CFU/g)	40
8	ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (CFU/g)	40
9	การเปรียบเทียบผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (CFU/g)	41
10	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	43
11	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน	45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร	27
2	เครื่องควบคุม	27
3	เครื่องควบคุมระบบน้ำ	28
4	ถังบรรจุอากาศ	28
5	วัดการเจริญโดยวิธีเกลี่ยเชื้อด้วยวิธี Spread plate	29
6	การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	30
7	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส	31
8	กราฟมาตรฐานสารละลายไทโรซีน	32
9	กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก	33
10	การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	35
11	การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	35
12	การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	36
13	โคโลนีของ *Bacillus licheniformis* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar	36
14	*Bacillus licheniformis* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth	37
15	ตะกอนเซลล์หลังจากการปั่นเหวี่ยง	37
16	ส่วนใสที่ผ่านการกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร	37
17	สารที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	38
18	ตะกอนเซลล์หลังจากการปั่นเหวี่ยง	38
19	ตะกอนเซลล์ที่ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M, pH 7.0)	38
20	การกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยวิธีไดอะไลซิส	39
21	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis*	39
22	ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (CFU/g)	41
23	ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (CFU/g)	42

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อาหารทะเลแห้งและอาหารทะเลแปรรูปเป็นสินค้าที่สำคัญประเภทหนึ่งในประเทศไทย (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2554) และผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นสินค้าประเภทของฝากที่สำคัญของจังหวัดบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย ได้แก่ กุ้งแห้ง ปลาแห้ง หมึกแห้ง หมึกอบชุบน้ำเชื่อม หมึกตัวฉาบ หอยแห้งและปูกรอบ เป็นต้น ซึ่งพบมากในภาคตะวันออก แถบจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ก) รวมทั้งอาหารทะเลแห้งและอาหารทะเลแปรรูปได้รับความนิยมและมีผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้นในการนำมาบริโภคทั้งคนไทยและคนในประเทศแถบเอเชีย ทำให้เป็นสินค้าเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยจำนวนมหาศาล (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ข) ในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยมีสถิติการส่งออกอาหารทะเลประเภทปลาหมึกและผลิตภัณฑ์รวมปริมาณ 65,474.76 ตัน คิดเป็นเงิน 12,160 ล้านบาท และมีสถิติการส่งออกอาหารประเภทกุ้งปรุงแต่งและกุ้งแห้งปริมาณ 114,250.56 ตัน คิดเป็นเงิน 39,554.40 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร, 2557) แสดงให้เห็นว่าอาหารทะเลเป็นสินค้าที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจไทยเป็นอย่างยิ่ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับคุณภาพของอาหารทะเลแห้งและอาหารทะเลแปรรูป พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ยกตัวอย่างเช่น สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ก) พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Micrococcus* และแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Corynebacterium* spp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. ozaenae*, *Listeria* spp. และ *Proteus mirabilis* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรี นอกจากนี้เมื่อนำผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมาศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็ม พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* ส่วนการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีพบ *Proteus*, *Enterobacter* และ *Klebsiella* (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ข) ศิริโฉม ทุ่งเก้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์ (2550) ได้รายงานการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปลาหมึกแห้งปรุงรสพร้อมบริโภค พบการปนเปื้อนของ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* และ *Acinetobacter* ในขณะเดียวกันการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในต่างประเทศก็แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง เช่น ปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) และปลานวลจันทร์ตากแห้ง (*Cirrhinus microlepis*) ที่จำหน่ายในเมือง Penghu ประเทศไต้หวัน พบแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสารพิษประเภทฮิสตามีนหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus morganii*, *P. vulgalis*, *P. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Serratia fonticola*, *S. liquefaciens*, *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *Providencia stuartii* และ *Citrobacter freundii* (Huang et al., 2010) และปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) เค็มตากแห้งในประเทศอินเดียพบการปนเปื้อนของ

Micrococcus luteus, *Pseudomonas* และ *Alcaligenes* (Lakshmanan et al., 2002) แบคทีเรียที่ปนเปื้อนเหล่านี้ส่งผลทำให้อาหารทะเลแห้งเน่าเสียและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Jeyasekaran et al., 2004) ดังนั้นการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งถือเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทำให้อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยมีคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ของประเทศไทยและระดับสากล

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น แบคเทอริโอซิน เป็นต้น (ten Brink et al., 1994) แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงส่งผลให้สารชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในทางด้านการแพทย์และด้านอุตสาหกรรมอาหาร (Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) นอกจากนี้ Anthony et al. (2009) ได้ศึกษาถึงสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย การศึกษานี้ได้รับความสนใจมากขึ้นในการที่จะนำมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค การถนอมอาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียและการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียคือ *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากดินตะกอนจากน้ำทิ้งในโรงฆ่าสัตว์ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด ซึ่งคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* มีคุณสมบัติเป็นสารแบคเทอริโอซิน จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะศึกษาถึงการพัฒนาการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารทะเลแห้ง เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นสารปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกทำหน้าที่ยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรียก่อโรค โดยการไปปิดกั้นส่วนที่พิษจะเข้าสู่เซลล์และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้เพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเข้ายึดเกาะและเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ไว้ต่อสู้กับเชื้อโรคได้ (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยจำนวน 2 โครงการ ได้แก่ (1) โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค” ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553-2555 และ (2) โครงการวิจัยเรื่อง “สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี” ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556-2559 คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งไม่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค และยังมีประโยชน์และมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค รวมทั้งมีคุณสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะทำให้อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยมีจุดเด่นและมีคุณค่าครบทุกด้าน ทั้งเป็นอาหารที่มีความปลอดภัย สะอาดและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และยังเป็นอาหารเสริมสุขภาพได้เช่นกัน ซึ่งจะเป็นการพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยสู่มาตรฐานสากลอย่างมีเอกลักษณ์และเด่นชัดต่อไป

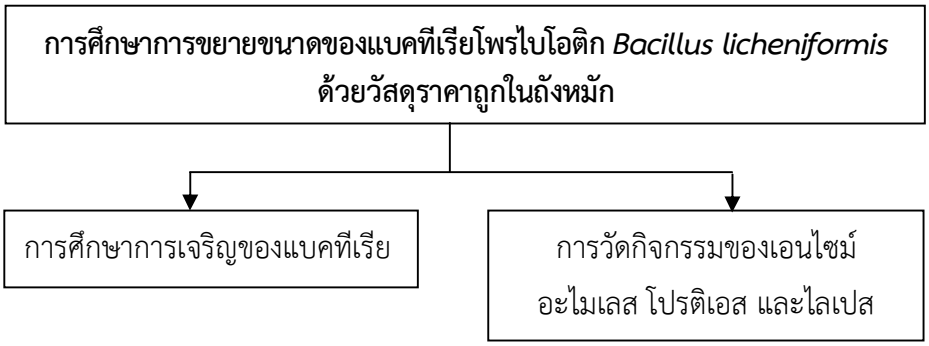
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

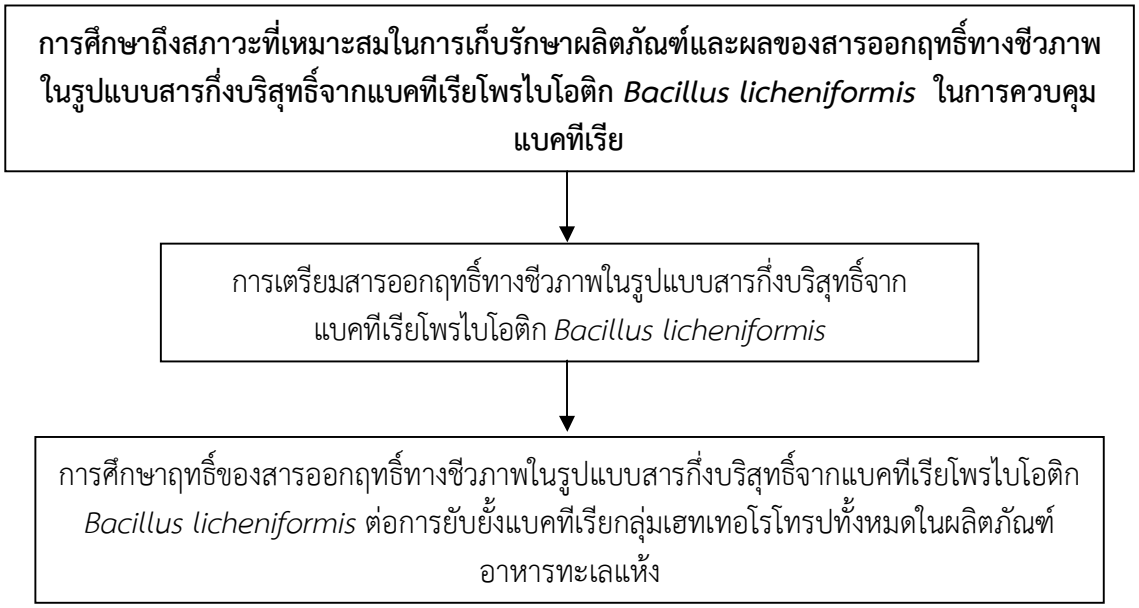
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้ง

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยในปีที่ 1 จะทำการศึกษาถึงการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมัก ซึ่งเป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยเรื่อง “สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี” ที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2559 และจะดำเนินการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิด *Bacillus licheniformis* (PBL) เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย





ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้ง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. อาหารทะเล
2. แบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารทะเล
3. โพรไบโอติก
4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทะเล และการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ
5. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

1. อาหารทะเล

อาหารทะเลมีหลากหลายชนิด อาทิ ปลา กุ้ง หอย ปู หมึก สาหร่ายทะเล แมงดาทะเล แมงกะพรุนและปลิงทะเล เป็นต้น ขณะนี้อาหารทะเลเป็นอาหารยอดนิยมของคนทั่วโลก เพราะนอกจากจะมีรสชาติที่อร่อย มีกรรมวิธีในการปรุงที่หลากหลาย และยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก ไม่ว่าจะเป็นด้านโปรตีน วิตามินและเกลือแร่ รวมถึงมีธาตุอาหารบางอย่างที่สำคัญและจำเป็นสำหรับมนุษย์ที่หาได้เฉพาะในอาหารทะเลเท่านั้น เช่น ธาตุไอโอดีน เป็นต้น (ศรีสมร คงพันธุ์ และมณี สุวรรณผ่อง, 2533)

การถนอมอาหารโดยวิธีการหมักเกลือและการตากแห้ง เป็นวิธีการหลักของครัวท้องถิ่น การทำกับข้าวจากอาหารแห้ง การทำเครื่องปรุงจากของหมัก ของแห้งและของดอง จึงมีความสำคัญพอ ๆ กันหรือมากกว่าการทำกับข้าวจากของสด การถนอมและดัดแปลงอาหารสัตว์น้ำได้พัฒนาไปสู่ปลาร้า ปลาเจ่า น้ำปลา และเยื่อเคยหรือกะปิ อันเป็นเครื่องปรุงรสหลักของกับข้าว ลักษณะของอาหารทะเลที่ทำเค็ม ทำแห้ง ทำดอง ได้แก่ ปลาเค็ม ปลาแห้ง กุ้งแห้ง กะปิ หอยแห้ง ปลาหมึกแห้ง และนับเป็นสัญลักษณ์ของแหล่งท่องเที่ยว เช่น จังหวัดชลบุรีและระยอง เป็นต้น (ชมพู่ ยิ้มโต, 2550)

ประโยชน์ของอาหารทะเล

อาหารทะเลมีประโยชน์เนื่องจากมีไขมันน้อยกว่าโปรตีนจากสัตว์อื่น ๆ ทั้งยังอุดมไปด้วยฟอสฟอรัสและแคลเซียมที่จำเป็นสำหรับร่างกาย นอกจากนั้นยังมีโอกาสปนเปื้อนหรือมีการตกค้างของสารพิษน้อยกว่าเนื้อสัตว์ประเภทอื่น ๆ ประโยชน์ของอาหารทะเล เช่น

1. ประโยชน์จากหมึก ในหมึกจะมีกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 อยู่สูงมาก แม้ว่าหมึกจะมีโคเลสเตอรอลสูง แต่โอเมก้า 3 ที่มีอยู่ในหมึกนั้นจะไปช่วยต่อต้านไม่ให้ร่างกายมีโคเลสเตอรอลสูงขึ้นได้ และยังพบว่าโคเลสเตอรอลที่มีอยู่ในหมึกนั้นจะช่วยให้ผิวหนังแต่งตึง ใบหน้าไม่เหี่ยวย่นอีกด้วย
2. ประโยชน์จากปูและหอย ในเนื้อปูและหอยจะมีกรดอะมิโนอิสระกว่า 10 ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ กรดกลูตามิก ไกลซีน โพรลีน ฮีสทีดีนและอาจีนีน เป็นต้น นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ บีหนึ่ง บีสอง บีสาม ซีและดี นอกจากนี้ในหอยนางรมยังมีสารประกอบสำคัญที่เรียกว่า

เทารีน (Taurine) และมีแร่ธาตุสังกะสีอยู่มาก ซึ่งสารสองตัวนี้จะทำงานร่วมกัน และมีผลต่อการส่งเสริมสมรรถภาพทางเพศได้ดี

นอกจากนี้ในอาหารทะเลทุกชนิดยังมีสารไอโอดีนสูงช่วยให้ไม่เป็นโรคคอพอก และมีโอเมก้า 3 ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวอยู่สูง มีผลช่วยลดโคเลสเตอรอลในเส้นเลือดได้ ป้องกันเลือดจับตัวเป็นก้อนซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะหัวใจล้มเหลว และยังช่วยพัฒนาสมองและพัฒนาระบบประสาทก่อให้เกิดผลดีต่อการรักษาโรคความจำเสื่อมได้อีกด้วย (ศรีสมร คงพันธุ์ และมณี สุวรรณผ่อง, 2533)

2. แบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารทะเล

จุลินทรีย์หลายร้อยชนิดเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแก่คน สัตว์ พืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จุลินทรีย์ที่จะเกิดโรคแก่สิ่งมีชีวิตที่เข้าไปอาศัยอยู่หรือที่เรียกว่าโฮสต์ได้นั้นจะต้องมีกลไกที่จะเอาชนะระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ แต่ถ้าโฮสต์มีความต้านทานสูงกว่าจะสามารถทำลายจุลินทรีย์เหล่านั้นได้และไม่เกิดโรค ปัจจัยที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถก่อโรคได้ขึ้นอยู่กับสารพิษ (Toxin) ที่สร้างขึ้นซึ่งอาจทำลายเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายโฮตส์หรือทำลายเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อระบบประสาท นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีสารบางอย่างและเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนประกอบของเนื้อเยื่อโฮสต์ ทำให้สามารถบุกเข้าเนื้อเยื่อโฮสต์และทำอันตรายโฮสต์ได้ ซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารจากสิ่งแวดล้อมเกิดจากการนำพา ได้แก่ ฝุ่นละออง แมลง สัตว์และมนุษย์ และการปนเปื้อนที่มาจากผู้ปฏิบัติงานผลิตอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ใช้มือสัมผัสกับอาหาร เป็นสื่อที่ดีที่จะนำจุลินทรีย์ไปปนเปื้อนในอาหารได้ ดังนั้นควรมีการจัดสภาวะแวดล้อมในการผลิตให้เหมาะสม และให้ความรู้แก่ผู้สัมผัสอาหารเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไปสู่ผลิตภัณฑ์ได้ (บัญญัติ บุญญา, 2546)

2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคลิสทีรีโอซีส (Listeriosis) มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา เชื้อนี้สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น น้ำโคลน น้ำทิ้ง พืช และสัตว์ รวมทั้งอาจพบในอุจจาระของมนุษย์ การระบาดอาจเกิดจากการบริโภคน้ำนมและเนยแข็งที่มีเชื้อปะปนอยู่ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะอาศัยอยู่กับแมคโครฟาจ (Macrophage) การเกิดโรคอาจเกิดได้ทั้งแบบที่ไม่รุนแรงและรุนแรง และรุนแรงมากจนเสียชีวิตได้ ส่วนใหญ่เกิดกับเด็กในระยะแรกเกิด และผู้ที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกันจะแสดงอาการที่รุนแรง บางรายอาจทำให้เสียชีวิตได้ การติดเชื้อในเด็กทารกส่วนใหญ่จะติดจากแม่ที่ติดเชื้อนี้ เด็กที่ติดเชื้อนี้จะเสียชีวิตเนื่องจากติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) และโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ส่วนผู้ใหญ่จะแสดงอาการของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การป้องกันทำได้โดยหลีกเลี่ยงการบริโภคเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ติดเชื้อ และการตรวจเชื้อในระยะช่วงเริ่มตั้งครรภ์ โรคนี้ถือว่าเป็นโรคติดต่อทางอาหารที่สำคัญโรคหนึ่ง ในบางประเทศมีการบังคับให้มีการตรวจหาเชื้อ *Listeria* ในอาหารแช่แข็งด้วย (คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาเคมีและจุลชีววิทยาของอาหาร, 2539)

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยแฟลก-เจลลาปลายเซลล์หรือขั้วของเซลล์ มีขนาด 0.5-1.0×1.5-5.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่มีโครงสร้างคล้ายแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน ส่วนสายของพอลิ-แซ็กคาไรด์ไซด์ (Polysaccharide side chain) ที่ยื่นออกจากเยื่อหุ้มชั้นนอก (Lipopolysaccharide, LPS) เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (Susceptible) ต่อแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) หรือไพโอซิน (Pyocin) *P. aeriginosa* ยังมีชั้นเมือก (Slime layer) ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์และมีพิไลที่ผิวเซลล์ด้วย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544) *P. aeriginosa* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำในคนปกติทั่วไป โรคที่พบในคนทั่วไปจึงพบได้น้อย ได้แก่ หูชั้นกลางอักเสบเรื้อรัง (Chronic otitis media), Chronic paronychia (Green nail syndrom) เหงือกอักเสบเรื้อรัง (Chronic gingivitis) หรือเหงือกเป็นหนอง (Pyorrhea) การติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้ที่ติดยาเสพติด โดยการใช้เข็มฉีดยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (โสภณ คงสำราญ และคณะ, 2524)

2.3 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนขนาดใหญ่ เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์ได้ สปอร์จะอยู่บริเวณกลางเซลล์หรือเกือบถึงปลายเซลล์และไม่ทำให้เซลล์บวม เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือแบบแอโรป ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ 10-49 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้คือ 4.9-9.3 สปอร์ถูกทำลายได้เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3-4 นาที ตามปกติแบคทีเรียชนิดนี้พบได้ตามธรรมชาติ เช่น ดิน ฝุ่นละออง และปนเปื้อนในอาหาร เช่น ข้าวและแป้ง นอกจากนั้นยังพบในผักและเนื้อสัตว์ *B. cereus* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคจากการบริโภคอาหารชนิดหนึ่ง (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2546) โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากสายพันธุ์ที่สร้าง Enterotoxin ซึ่งมี 2 ชนิดด้วยกัน ชนิดที่ 1 Emetic toxin ท๊อกซินชนิดนี้จะทนความร้อน และทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษหลังจากรับประทานอาหารที่มีพิษของเชื้อเข้าไป 1-6 ชั่วโมง โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนเป็นหลัก และมีอุจจาระร่วงเล็กน้อย ชนิดที่ 2 Diarrheal toxin เป็นท๊อกซินที่ไม่ทนความร้อน อาการจะเกิดภายใน 10-12 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มีพิษของเชื้อเข้าไป อาการจะเริ่มด้วยการปวดท้องรุนแรง อาเจียนและอุจจาระร่วงมาก (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2531)

2.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เซลล์เกาะกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น หรืออาจอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ จัดเป็นพวกเจริญแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน เมื่อเจริญบนอาหารแข็งธรรมดามักให้โคโลนีสีเหลือง แต่บางสายพันธุ์โคโลนีอาจไม่มีสี ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) และเอนไซม์นิวคลิเอสชนิดทนความร้อน (Thermostable nuclease) ได้ รอดชีวิตอยู่ได้ในอาหารที่มีเกลือและน้ำตาลความเข้มข้นสูง ๆ ช่วงอุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญ คือ 35-40 องศาเซลเซียส ทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ดี (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2546) *S. aureus*

บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ คือ Enterotoxin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดีและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วย สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาที ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิน้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* มีชื่อเรียกว่า Staphyloenteroxicisis และ Staphyloenterotoxemia (บัญญัติ สุขศรีงาม และคณะ, 2551) อาหารเป็นพิษที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มี Enterotoxin ของ *S. aureus* มีระยะฟักตัวสั้นกว่าอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียอื่น ๆ คือ 2 หรือ 4 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง บางครั้งอาจพบมูกเลือดในอุจจาระ อาการที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ไม่รุนแรง (วิลาวัณย์ เจริญจิระ-ตระกูล, 2539)

2.5 *Corynebacterium*

Corynebacterium (Coryne เป็นภาษากรีก แปลว่า กระบอง) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesotroph) หรือพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrotroph) เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผักและผลิตภัณฑ์เนื้อ พบได้ทั่วไปในพืช เช่น ถั่ว มะเขือเทศและข้าวโพด บางชนิดก่อโรคในคน เช่น *C. diphtheria* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคคอตีบ มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 51-63 เปอร์เซ็นต์โมล (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

2.6 *Proteus*

แบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Proteus* มีรูปร่างได้หลายแบบคือ บางสายพันธุ์อาจมีรูปร่างขนาดสั้นมากแบบ Coccobacilli และบางสายพันธุ์มีรูปร่างยาว เป็นเส้น เคลื่อนที่ได้ ไม่หมักย่อยน้ำตาลแล็กโตส ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar และอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ คล้ายคลึงกับโคโลนีของ *Salmonella* และ *Shigella* บางสายพันธุ์ให้ลักษณะโคโลนีที่แผ่กระจายคล้ายคลื่นจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ (Swarming colony) ลักษณะแผ่กระจายจะน้อยลงหรือหายไป เมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของวุ้นมากขึ้น เช่น 5 % หรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีอิเลคโตรไลท์ เช่น Cystine-lactose-electrolyte-deficiency (CLED) agar การทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญเพื่อวินิจฉัยสกุล *Proteus* ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ Urease และ Phenylalanine deaminase ให้ผลบวก และให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

แบคทีเรียพวกนี้มีความสำคัญในการทำให้อาหารประเภทโปรตีนเกิดการเน่าเสีย เช่น ทำให้เนื้อเน่าเสียโดยการสลายในสภาพไม่มีออกซิเจน (Putrefaction) ทำให้เกิดการเหม็นเน่า เนื่องจากสารต่าง ๆ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ อินโดล แอมโมเนีย เอมีน ทำให้ไข่เกิดการเน่าเสียแบบเกิดสีดำ (Black rot) โดยไข่แดงจะมีสีดำ หลังจากนั้นทุกส่วนของไข่จะมีสีน้ำตาลดำ มีกลิ่นเหม็นเน่าเนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ นอกจากนี้อาจมีก๊าซเกิดขึ้นภายในด้วย ทำให้นมมีกลิ่นเหม็นหืนเนื่องจากมีเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันในนม ทำให้นมมีรสขมเนื่องจากการสลายโปรตีน และยังทำให้อาหารทะเล เช่น ปู หอย เกิดกลิ่นเหม็นเน่าอีกด้วย (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

2.7 *Yersinia enterocolytica*

Yersinia enterocolytica ลักษณะเซลล์รูปท่อน ติดสีแกรมลบ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) จัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ไม่เคลื่อนที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มี 2 ชนิด ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (Peritrichous flagella) คือ *Y. pseudotuberculosis* และ *Y. enterocolitica* อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อนี้อยู่ที่ 30-37 องศาเซลเซียส (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548)

Y. enterocolytica เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (Enteritis) เมื่อติดเชื้อจะทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วง และอาจมีอาการปวดมึน มีไข้ อาเจียน มีรายงานการแพร่ระบาดจากการบริโภคน้ำนมดิบและนมช็อกโกแลตในบางประเทศ (ในทวีปยุโรป) แบคทีเรียชนิดนี้มีความสำคัญรองจาก *Salmonella* และ *Shigella* นอกจากจะทำให้เกิดการเจ็บป่วยในระบบทางเดินอาหารแล้ว เชื้อ *Y. enterocolytica* ยังทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยกับอวัยวะอื่น ๆ ได้แก่ ตับ ม้าม และปอด โดยทำให้เกิดอาการคล้ายกับวัณโรค (คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาเคมีและจุลชีววิทยาของอาหาร, 2539)

2.8 *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงในปี ค.ศ. 1885 แบคทีเรียชนิดนี้มักจะทำให้เด็กทารกในประเทศที่กำลังพัฒนาเกิดอาการอุจจาระร่วง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียในลำไส้จึงพบบ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร การจัดจำแนกชนิดของ *E. coli* ได้มีการจำแนกออกตามความรุนแรงของอาการเกิดโรค ลักษณะในการเจริญและลักษณะทางพันธุกรรมได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

2.8.1 กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์บุผนังลำไส้ (Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)) พบว่าสัมพันธ์กับการเกิดอุจจาระร่วงเรื้อรังที่มีระยะดำเนินโรคนานกว่า 14 วัน ผู้ป่วยมีไข้ต่ำ อาเจียนและถ่ายเป็นน้ำปนมูก พบการถ่ายเป็นเลือดโดยเฉพาะในเด็ก ลักษณะเด่นของการเกิดโรคคือ พบเชื้อเกาะรวมกลุ่มกันคล้ายกองอิฐ (Stacked brick) อยู่บนเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้เล็ก การรวมกลุ่มของเชื้อกระตุ้นให้มีการหลั่งสารเมือกทำให้เชื้อสามารถรวมกลุ่มได้มากขึ้น พบ Microvilli ของเซลล์เยื่อบุผิวมีขนาดสั้นลงและการดูดซึมต่าง ๆ ลดลง ทำให้ผู้ป่วยขาดสารอาหารและมีอาการถ่ายเหลว เชื้อสามารถสร้างสารพิษที่ออกฤทธิ์สามารถทำลายเซลล์ อาจทำให้ตรวจพบเม็ดเลือดแดงในอุจจาระได้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)

2.8.2 กลุ่มที่สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)) ได้มีการยอมรับเอนเทอโรท็อกซิเจนิก อีโคไล ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในคนตั้งแต่ปี ค.ศ.1968 ในขณะที่ประเทศอินเดียและบังคลาเทศให้ความสำคัญกับแบคทีเรียชนิดนี้ โดยถือว่าเป็นศัตรูร้ายแรง และต่อมา ETEC ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับนักท่องเที่ยว จึงมีชื่อว่า “Traveller’s

diarrhea” หรือ “Turista” ซึ่งมักพบในนักท่องเที่ยวที่เดินทางจากประเทศที่เจริญ มีสุขอนามัยดีมายังประเทศกำลังพัฒนา

ETEC เป็นสาเหตุใหญ่ของการเกิดโรคท้องเดินในผู้ใหญ่และเด็ก Enterotoxin ไม่ทนความร้อน อาการของโรคที่เกิดจาก ETEC คือ อุจจาระร่วงและถ่ายเป็นน้ำ (Watery diarrhea) มีไข้เล็กน้อย รู้สึกไม่สบายกาย (Malaise) คลื่นไส้ (Nausea) เป็นตะคริวบริเวณช่องท้อง (Abdominal cramps) ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง อาการคล้ายกับอาการอหิวาตกโรค

อาหารที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคระบาดจาก EPEC, EIEC และ ETEC ได้แก่ เนื้อสัตว์ เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อแกะ น้ำนมดิบ และน้ำ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้สุก และน้ำนมที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548)

2.8.3 กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในเด็กทารก (Infantile diarrhea) โดยผู้ป่วยมีอาการไข้อาเจียนและอุจจาระมีมูกปนแต่ไม่มีเลือด มีรายงานการเกิดโรคนี้จากทั่วโลก กลไกการเกิดโรคอุจจาระร่วงไม่ได้เกิดจากการสร้างสารพิษหรือการบุกรุกเข้าเซลล์ แต่เกิดจากการที่ EPEC มีพลาสมิดขนาด 50-70 ล้านดาลตัน (Mda) ที่ควบคุมการสร้างแอดฮีซินชื่อ ETEC Adherence factoe (EAF) ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อสามารถเกาะติด Hep-2 cells ในหลอดทดลองได้ด้วยลักษณะที่แตกต่างจากเชื้ออื่น เรียกว่า localized adherence และการมียีน *eae* บนโครโมโซมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชื่อ อินทิมิน (Intimin) ขนาด 94 กิโลดาลตัน ทำให้เซลล์สามารถเกาะติดกับผนังของลำไส้ เกิดการเรียงตัวใหม่ของไซโทสเคลีทัน (Cytoskleton) และสายแอกทิน (Filamentous actin) ภายใต้บริเวณที่แบคทีเรียเกาะอยู่เป็นรูปคล้ายฐานหรือแท่นรูปปั้น (Cup-like pedesstals) เกิดการทำลายไมโครวิลไล (Microvilli) จนเกิดรอยราบเรียกว่า Attaching and effacing lesion เรียกกลไกนี้ว่า Attaching and effacement ผู้ป่วยจะเกิดอุจจาระร่วงในที่สุด เนื่องจากเซลล์สูญเสียการดูดสารกลับ (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2553)

2.8.4 กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)) มีกลไกในการก่อโรคคล้ายเชื้อ *Shigella* คือมีการบุกรุกเข้าไปในเซลล์ของผนังลำไส้ แบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ชั้นเยื่อเมือก (Mucosa, Submucosa) ทำลายเซลล์จนตายและบุกรุกไปยังเซลล์ข้างเคียงต่อไป เชื้อนี้มักจะก่อโรคอุจจาระร่วงในเด็กที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีสุขาภิบาลไม่ถูกสุขลักษณะ อาการทางคลินิกมีความคล้ายคลึงกับโรคบิดที่เกิดจากเชื้อ *Shigella* ได้แก่ มีไข้ ปวดท้อง อุจจาระมีเม็ดเลือดขาว เลือด และมูกปน

EIEC ส่วนใหญ่ประมาณ 2 ใน 3 จะมีลักษณะทางชีวเคมีแตกต่างจาก *E. coli* ทั่วไป คือ ไม่มีเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส และไม่หมักย่อยน้ำตาลแล็คโตส เชื้อส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ ยกเว้นซีโรไทป์ O124, O144 และ O167 บางสายพันธุ์ เชื้อบุกรุกเข้าทำลายเซลล์เยื่อบุตาของหนูตะเภาทำให้ตาอักเสบได้ จึงใช้เป็นการทดสอบสำหรับแยกเชื้อนี้จาก *E. coli* สายพันธุ์อื่น เรียกการทดสอบนี้ว่า Sereny test (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2553)

2.8.5 กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)) สายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารพิษของ *Shigella* (Shiga-like toxins) และเป็นสารพิษประเภทเวอโรทอกซิน (Verotoxin) คือ สารพิษที่สามารถฆ่าเซลล์เวอโร (Vero cells) ในห้องทดลองได้ สารพิษของ EHEC มี 2 แบบ คือ SLT-I และ SLT-II (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

3. โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้มากขึ้นและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ จุลินทรีย์โพรไบโอติก ได้แก่ จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium* sp. ได้มีการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาผลิตอาหารหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดองและเนื้อหมัก และมีการผลิตในรูปของแคปซูลและเมล็ดออกมาจำหน่ายตามท้องตลาด นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในอาหารสัตว์ เร่งการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดโรค (อุษามาส จริยวรานุกุล, 2548)

การเจริญของโพรไบโอติกจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้นั้น เป็นไปตามกระบวนการธรรมชาติของจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากกว่าจะสามารถแย่งชิงอาหารได้ดีกว่า อีกทั้งยังปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีมากกว่านั้น ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถอยู่รอดได้ และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียจำพวกนี้ในระหว่างการเจริญจะทำให้ระดับความเป็นกรด-ด่างในสภาพแวดล้อมรอบ ๆ นั้นลดลง เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้ออื่น ๆ รวมทั้งเชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้พบว่าโพรไบโอติกบางชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะ (Adhesion) ของเชื้อโรคกับผนังเซลล์ภายในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ และบางชนิดยังสามารถช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิต้านทานชนิด Immunoglobulin A ซึ่งจะช่วยกำจัดเชื้อโรคได้ โพรไบโอติกใช้ได้ดีในการควบคุมโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ช่วยป้องกันโรคอุจจาระร่วง ซึ่งเกิดจากการที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนไปกับอาหาร เมื่อเข้าสู่ระบบการย่อยอาหารจะเกิดการแบ่งตัวอย่างมาก ทำให้เกิดสภาวะผิดปกติในทางเดินอาหาร เป็นเหตุให้เกิดอาการอุจจาระร่วงได้ ดังนั้นการที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกอยู่ในทางเดินอาหารในปริมาณเพียงพอ จะทำให้สภาวะไม่เหมาะสมกับการแบ่งตัวของเชื้อโรค เป็นเหตุให้เชื้อโรคไม่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคนั้น ๆ ได้ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2547)

โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นทารก มีหลายชนิด ดังตารางที่ 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 ช่วยลดปริมาณน้ำตาลแล็คโตสในอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงได้ นอกจากนี้สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอ-ริโอซิน ช่วยกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร น้ำย่อยบางชนิดจากโพรไบโอติกจะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่พิษจะเข้าสู่เซลล์ และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียเข้าเกาะได้ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ไว้ต่อสู้กับเชื้อโรค และกระตุ้นการสร้างสารป้องกันโรคในร่างกาย เช่น Gamma-interferon, Interleukin-12 และ Interleukin-18 เป็นต้น (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทะเล และการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

รัชฎาวรรณ เดชมณี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์ (2548) ได้ศึกษาแบคทีเรียปฏิปักษ์คือ *Bacillus firmus* สายพันธุ์ KPS46 ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ได้ โดยทำการแยกสารทุติยภูมิดังกล่าวโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 และตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอล 80 % จะได้สารทุติยภูมิหยาบที่แสดงประสิทธิภาพดี มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเป้าหมาย (Minimum inhibition concentration) ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสารดังกล่าวไปแยกชนิดโดยวิธีแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography) ได้ผลออกมาทั้งหมด 8 แถบ แถบที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเป้าหมายได้ดีมี 3 แถบ และเมื่อนำสารทั้ง 3 แถบ ไปทดสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) และวิเคราะห์ทางเคมี พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดที่ผลิตโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

B. firmus สายพันธุ์ KPS 46 มีลักษณะที่แตกต่างกัน แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองได้ดีใกล้เคียงกัน ทั้งนี้สารทั้ง 3 แถบมีค่า Rate of flow (Rf) เท่ากับ 0.25, 0.33, 0.37 ตามลำดับ โดยตำแหน่งแถบสารที่ Rf เท่ากับ 0.25 มีช่วงการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ในขณะที่ตำแหน่งแถบสารที่ Rf เท่ากับ 0.33 มีช่วงการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตำแหน่งแถบสารที่ Rf เท่ากับ 0.37 มีช่วงการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร

สุดารัตน์ บุญยง (2548) ได้ทำการศึกษาการคัดแยก *Bacillus* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ จากดินในประเทศไทย ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Cross streak พบว่า *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและรา ส่วนการศึกษาการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารเหลว Luria Bertani Broth (LB), Nutrient Broth (NB) และ Trypticase Soy Broth (TSB) โดยวิธี Paper disk diffusion พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB และ TSB โดยพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Serratia* sp. และราทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. สารต้านจุลชีพในส่วนใสซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 เดือน มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลา โดยมีการยับยั้งได้นาน 4-7 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ สารต้านจุลชีพทนต่อความร้อนระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส โดยมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกัน เมื่อได้รับความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่นำมาศึกษา การจำแนกชนิดของ *Bacillus* sp. K-05 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *B. subtilis* M04 เท่ากับ 99% จึงจัดว่า *Bacillus* sp. K-05 เป็น *B. subtilis* การสกัดแยกสารปฏิชีวนะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิลอีเทอร์ การแยกสารปฏิชีวนะโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography) ด้วยระบบตัวพา คือ เมทานอล-เอทิลอะซิเตท (5:95) พบว่าแยกสารได้ 5 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.21, 0.33, 0.43, 0.55 และ 0.79 ผลการทดสอบสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยมีระบบตัวพา คือ เฮกเซน-เอทิลอะซิเตท ได้สารที่บริสุทธิ์ 2 สาร มีลักษณะเป็นผงสีครีม ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยวิธีทางเคมีสรุปได้ว่า สารกลุ่ม 1 คือ Cyclo(Leu-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.1446 กิโลดาลตัน สารกลุ่มสองคือ Cyclo(Val-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 196.1269 กิโลดาลตัน ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีสาร Cyclic dipeptide ดังกล่าวเป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *B. subtilis*

นิตยา ลิ้มเจริญ และคณะ (2549) ทดลองใช้โพรไบโอติกชนิด *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ซึ่งแยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าการใช้ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ในอัตราส่วน 1:1 ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การศึกษาระยะเวลาที่

เหมาะสม พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกชนิด *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด หลังจากหยุดให้ 1 สัปดาห์แล้วค่อย ๆ ลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อให้อาหารผสมโพรไบโอติกอีกครั้งพบว่ากุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจำนวนเชื้อ *Vibrio* sp. ในลำไส้มีปริมาณลดลง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้เป็นที่น่าพอใจ โดยควรให้แบคทีเรียดังกล่าวอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเลี้ยง

ดนุวัต เพ็งอ้นและคณะ (2551) ทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้รวม 37 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Aeromonas hydrophila* ความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี (0.3 เปอร์เซ็นต์) ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง และความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 37 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ทนต่อสภาพความเป็นกรดสูง มีความสามารถในการทนเกลือน้ำดี และสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ และมีแบคทีเรียจำนวน 36 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อนำเชื้อดังกล่าวไปจัดจำแนกถึงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้ 10 ชนิด คือ *Bacillus amyloliquefaciens* 3 ไอโซเลท, *B. subtilis* 16 ไอโซเลท, *B. pumilus* 2 ไอโซเลท, *B. licheniformis* 7 ไอโซเลท, *B. megaterium* 1 ไอโซเลท, *Bacillus* sp. 4 ไอโซเลท, *B. circulans* 1 ไอโซเลท, *B. stearothermophilus* 1 ไอโซเลท, *Lactobacillus acidophilus* 1 ไอโซเลท และ *L. plantarum* 1 ไอโซเลท ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีและเหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตเป็นอาหารเสริมในปลาได้

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2557) ทำการศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ หมึกบดเผ็ดน้อยแห้งมาก หมึกบดอบเนยและหมึกบดในน้ำเชื่อม ที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถอยู่รอดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อเติมในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปต่อไป

Colakoglu et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *Aeromonas* sp. และ *Vibrio* sp. ในหอยและกุ้งที่ซื้อจากตลาดและห้องครัวของโรงแรมในเมือง Dardanelles ประเทศตุรกี โดยมีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 127 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอย 97 ตัวอย่าง และกุ้ง 30 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบ *Aeromonas* sp. และ *Vibrio* sp. ในตัวอย่าง 84 ตัวอย่าง โดย 22 ตัวอย่าง (26.7 เปอร์เซ็นต์)

ปนเปื้อนด้วย *V. alginolyticus* 8 ตัวอย่าง (9.4 เปอร์เซ็นต์) ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* 1 ตัวอย่าง (0.8 เปอร์เซ็นต์) ปนเปื้อนด้วย *V. parahaemolyticus* และ 24 ตัวอย่าง (29.1 เปอร์เซ็นต์) ปนเปื้อนด้วย *A. hydrophila*

Normanno et al. (2006) รายงานอุบัติการณ์ของ *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Salmonella* sp., *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) จำนวน 600 ตัวอย่าง ซึ่งจำหน่ายที่ตลาดในเมือง Puglia ประเทศอิตาลี โดยตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างจำนวน 47 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็น 7.83 เปอร์เซ็นต์ และ 2.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบ *Salmonella* sp. ในตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.16 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios และแบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* รวมทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios ในหอยสองฝาในช่วง 3 ปีของการสำรวจ

Benerjee et al. (2007) ได้นำกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และไข่อาร์ทีเมีย มาคัดแยกแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสามารถแยกได้ 10 ชนิด จากนั้นนำเชื้อเหล่านั้นไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียประจำถิ่นที่แยกได้จากน้ำทะเล คือ *Bacillus subtilis* AB65, *B. pumilus* AB58, *B. licheniformis* AB69 และเปรียบเทียบกับการใช้ยาออกซี่เตตระไซคลิน คลอแรมฟินิคอล เจนตามัยซิน และบาซิทาซิน สำหรับการควบคุมทางชีวภาพที่ใช้ในโรงเพาะฟักและอนุบาลกุ้ง โดยใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. เป็นตัวแทนในการทดสอบคือ *V. alginolyticus* VaM11 และ *V. parahaemolyticus* VbM1 สามารถพิสูจน์ได้ว่าสามารถลดปริมาณแอมโมเนียและไนโตรเจนลงได้ แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบจำนวน 90 เปอร์เซ็นต์ ถูกยับยั้งโดย *B. subtilis* AB65 ส่วน *B. pumilus* AB58 และ *B. licheniformis* AB69 สามารถยับยั้งเชื้อได้ 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับออกซี่เตตระไซคลิน คลอแรม-ฟินิคอล และเจนตามัยซิน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนบาซิทาซินสามารถยับยั้งได้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และได้ทำการศึกษาการเข้าแย่งพื้นที่ของแบคทีเรียประจำถิ่นจากทะเลไม่ให้เชื้อก่อโรคเพิ่มจำนวนโดยการใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคลงจาก 10^8 เป็น 10^2 CFU/mL ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในกุ้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ และแบคทีเรียเหล่านี้สามารถลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำโดยวิธีทางชีวภาพอีกด้วย

Lahtinen et al. (2007) ได้ทำการทดลองนำส่วนใสและส่วนใสที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Bifidobacterium* 38 สายพันธุ์ ที่ได้จากคนสูงอายุ มาทำการทดสอบสารปฏิชีวนะในการการยับยั้ง *S. aureus* RN4220, *E. coli* K-12, *Salmonella enteric* serovar Typhimurium ATCC 14028 พบว่า *Bifidobacterium* 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ มีค่าเท่ากับ 23.2 ± 19.1 ถึง 50.4 ± 26.7 เปอร์เซ็นต์ของฤทธิ์ยับยั้งของไนซินที่ความเข้มข้น 50 IU/mL ส่วน *Lactobacillus reuteri* SD2112 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต Reuterin สามารถยับยั้งได้ 86.0 ± 24.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ *B. lactis* Bb-12 เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดดังกล่าว นอกจากนี้ *Bifidobacterium* ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* หรือ *S. enterica* และสังเกตได้ว่าในการยับยั้งของ *Bifidobacterium* เกิด

จากการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเกิดจากการผลิตสารประกอบที่เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อน จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะของ *Bifidobacterium* ไม่ใช่กรดอินทรีย์แต่เป็นลักษณะที่ไม่พบทั่วไปของ *Bifidobacterium* อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนสูงอายุมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้

Parihar et al. (2008) รายงานการตรวจพบ *Listeria* sp. ในอาหารทะเลสดจำนวน 115 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในตลาดในรัฐ Goa ประเทศอินเดีย โดยใช้วิธีการคัดแยกด้วยการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียแบบ 2 ขั้นตอน จากนั้นจึงนำมาคัดแยกต่อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก 2 ชนิด และจัดจำแนกชนิดด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าตรวจพบ *Listeria* sp. ในอาหารทะเลจำนวน 28 ตัวอย่าง และตรวจพบ *L. monocytogenes* ในอาหารทะเลจำนวน 10 ตัวอย่าง โดย *L. innocua* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากที่สุดในตัวอย่างอาหารทะเล (18 ตัวอย่าง) ซึ่งการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในอาหารทะเลอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าแบคทีเรียชนิดนี้มีการปนเปื้อนต่อไปยังอาหารทะเลแบบพร้อมบริโภค

Kumar et al. (2009) รายงานอุบัติการณ์ของ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ให้ผลบวกต่อน้ำตาลแลคโตส และกลุ่มที่ให้ผลลบต่อน้ำตาลแลคโตสในอาหารทะเล และศึกษาลักษณะเฉพาะของความรุนแรงในการก่อโรคโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตรวจสอบ *Salmonella* ทั้งสองซีโรวาร์จากปลา กุ้ง ปู หอยกาบ หอยสองฝา หอยนางรม หมึก และหมึกกระดอง ที่จำหน่ายในตลาดขายปลาและสะพานปลาใจกลางเมืองโคชิน ประเทศอินเดีย จากการศึกษาพบว่า *Salmonella* ชนิดที่ให้ผลลบต่อน้ำตาลแลคโตสแยกได้ 18.9 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด ในขณะที่ 2 เปอร์เซ็นต์คือ *Salmonella* ชนิดที่ให้ผลบวกต่อน้ำตาลแลคโตส นอกจากนั้นทำการศึกษาปัจจัยของความรุนแรงใน *Salmonella* ชนิดที่ให้ผลลบและชนิดที่ให้ผลบวกต่อน้ำตาลแลคโตส โดยการตรวจหายีน 3 ชนิด คือ ยีน *inv*A, *stn* และ *fim*A จากการศึกษาพบว่า *Salmonella* ทุกสายพันธุ์ที่เป็นชนิดที่ให้ผลบวกและชนิดที่ให้ผลลบต่อน้ำตาลแลคโตส ตรวจพบยีน *inv*A, *stn* และ *fim*A ยกเว้น *Salmonella* IIIa ที่ตรวจไม่พบยีน *fim*A

Matamoros et al. (2009) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งโดยแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นและนำแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นมาศึกษาต่อเนื่องในการใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นทั้งหมด 5,575 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล พบว่า 132 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย และมีจำนวน 52 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ 14 ไอโซเลท (สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารทะเลเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรค จากนั้นจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก 7 ไอโซเลท ที่น่าสนใจ ประกอบด้วย *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 เพื่อยืนยันคุณสมบัติความชอบ

เจริญที่อุณหภูมิต่ำ 1 ใน 7 เชื้อที่แยกได้สามารถผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ส่วนกลไกในการยับยั้งของเชื้ออื่นที่แยกได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดเนื่องจากการแข่งขันในการจับกับสารตั้งต้น การไม่ปรากฏคุณสมบัติในการผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินทำให้แบคทีเรียเหล่านี้เป็นผลดีในการพิจารณาสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศฝรั่งเศส

Sansawat and Thirabunyanon (2009) ศึกษาการตรวจสอบกิจกรรมที่เป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus* 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากท่อทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ต่อ *Aeromonas hydrophila* ด้วยเทคนิค 2 แบบ คือวิธี Paper disc diffusion และ Agar well diffusion ซึ่ง *B. subtilis* สายพันธุ์ P33 และสายพันธุ์ 72 มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* นอกจากนั้นได้ศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติก ได้แก่ การทนกรดและการทนต่อเกลือน้ำดี, Autoaggregation, Coaggregation, ความไม่ชอบน้ำและการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเจริญในสภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสภาวะที่มี 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้ง *B. subtilis* สายพันธุ์ P33 และสายพันธุ์ 72 มีเปอร์เซ็นต์ของ Autoaggregation (35.7 เปอร์เซ็นต์ และ 42.2 เปอร์เซ็นต์) Coaggregation (11.1 เปอร์เซ็นต์และ 11.6 เปอร์เซ็นต์) ความไม่ชอบน้ำใน *n*-Hexadencane (25.6 เปอร์เซ็นต์และ 30.0 เปอร์เซ็นต์), Xylene (32.2 เปอร์เซ็นต์ และ 36.1 เปอร์เซ็นต์), Toluene (30.3 เปอร์เซ็นต์ และ 31.6 เปอร์เซ็นต์) และการยึดเกาะเซลล์ Caco- 2 เท่ากับ 4.21 และ 3.23 Log CFU/mL ตามลำดับ การศึกษาครั้งแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นโพรไบโอติกที่ดีเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งต่อไป

Huang et al. (2010) รายงานการตรวจสอบฮิสตามีนและแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างฮิสตามีนและคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง 46 ตัวอย่าง ที่ขายปลีกในตลาดในเมือง Penghu ประเทศไต้หวัน จากการศึกษาพบว่าอาหารทะเลแห้งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเกลือ ความชื้นและน้ำที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญ (a_w) ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยง่าย ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Escherichia coli* และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดอยู่ระหว่าง 5.60 - 7.57 mg/100g คิดเป็น 1.8 - 27.1 เปอร์เซ็นต์, 19.23 - 61.90 เปอร์เซ็นต์, 0.63 - 0.92 และ 10.14 - 168.56 mg/100g, 3.18 - 9.28 Log CFU/g, น้อยกว่า 3 - 210 MPN/g และน้อยกว่า 3 - 1,100 MPN/g ตามลำดับ โดยตัวอย่างอาหารปลาแห้งจำนวน 30.4 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของฮิสตามีนมากกว่า 5 mg/100 g ตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาที่กำหนดไว้สำหรับผลิตภัณฑ์ปลาในตระกูลคอมบรอย์และ/หรือผลิตภัณฑ์จากปลากลุ่มนี้ ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล 9 ตัวอย่าง ของปลาข้างเหลือง (*Selariodes leptolepis*) มีปริมาณฮิสตามีนสูงที่สุด (6.13 - 47.90 mg/100 g) โดยแบคทีเรียที่ผลิตฮิสตามีน 13 สายพันธุ์ ที่แยกมาจากตัวอย่างสามารถผลิตฮิสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ที่เติม 1.0% L-histidine (TSBH) ได้ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 7.80-531.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง *Enterobacter aerogenes* (1 สายพันธุ์) ที่แยกได้จากปลาข้างเหลืองมีความสามารถผลิตฮิสตามีนได้สูง

จากรายงานการศึกษายังไม่มีรายงานที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ เพื่อทำการควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารทะเลแห้ง รวมทั้งการเพิ่มคุณสมบัติทางด้านสุขภาพอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น คุณสมบัติด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะทำให้อาหารทะเลแห้งมีคุณภาพที่โดดเด่นทุกด้านทั้งทางด้านมาตรฐานจุลินทรีย์ รวมทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการในปัจจุบัน คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาข้อมูลและรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยครั้งนี้ ดังต่อไปนี้

5. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

5.1 อนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant)

อนุมูลอิสระ คือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็คตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554; Ames et al., 1993) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคมะเร็ง โรคต้อกระจก และโรคข้ออักเสบจากโรครูมาตอยด์ เป็นต้น (ประสงค์ เทียนบุญ, 2553) อนุมูลอิสระเกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การติดเชื้อโรคการได้รับรังสียูวี ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงลงได้ด้วยสารที่เรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

5.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554; Halliwell, 2009) สารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั้งในธรรมชาติและในร่างกายมนุษย์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลลิค (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (catotinoid) (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554; Velioglu et al., 1998) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบในร่างกายมนุษย์ เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) กลูตาไทโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) หรือสารประกอบ/โปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (albumin) บิลิรูบิน (bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) กลูตาไธโอน (glutathione) ทรานสเฟอริน (transferrin) ยูบิควินอล (ubiquinol) และยูเรต (urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะแต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณ

มากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “oxidative stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าว อนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติได้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

รำข้าว

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
2.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2.3 กระดาษกรอง Whatman No. 5
2.4 ถุงไดอะไลซิส
2.5 ออโตปิเปต P100 (Gilson, pipetman P100, กรุงปารีส, สาธารณรัฐฝรั่งเศส)
2.6 ออโตปิเปต P1000 (Gilson, pipetman P1000, กรุงปารีส, สาธารณรัฐฝรั่งเศส)
2.7 ตู้อบลมร้อน (Memmert, UFB 500, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
2.8 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, BE 400, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
2.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Daihan, Wacs-1450, เมืองโซล, สาธารณรัฐเกาหลี)
2.10 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CH30RF200, ประเทศญี่ปุ่น)
2.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Super Clean, Super Clean150 VC, จังหวัดกรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
2.12 หลอดทดลอง (Test Tube) 16 x 150 มิลลิลิตร และ13 x 100 มิลลิลิตร
2.1.3 ถังหมักแบบกวน (B.Braun Biotech International; Biostat B, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2.1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova; 4343, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

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 Methyl red reagent
3.12 แอมโมเนียมซัลเฟต

3.13 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
3.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์
3.15 กรดไฮโดรคลอริก
3.16 โซเดียมไนเทรต
3.17 แอมโมเนียมคลอไรด์
3.18 แคลเซียมคาร์บอเนต
3.19 น้ำแป้ง
3.20 Dinitrosalicylic acid
3.21 Casein
3.22 Sodium acetate
3.23 Acetic acid
3.24 Olive oil
3.25 อะซิโตน

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การศึกษาการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมัก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกตามผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร และปรับสภาวะให้เหมาะสมจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ คือการเพาะเลี้ยงในน้ำกลั่น โดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเติม 1 % (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

1.1 การศึกษาการขยายขนาดในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และคณะ, 2544; Yeh et al., 2006; Potumarthi et al., 2007)

1.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (ดัดแปลงมาจาก Anto et al., 2006; Gangadharan et al., 2006)

เตรียมหัวเชื้อ *B. licheniformis* โดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูป ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NA broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 A.U.

1.1.2 การเตรียมถังหมัก

เตรียมถังหมักตามที่คู่มือกำหนดไว้ ตรวจสอบระบบให้อากาศปลอดเชื้อ ระบบน้ำเย็น และระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้แก่ รำข้าว 175 กรัม ในน้ำกลั่น 3.5 ลิตร และ 1 % (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ลงในถังหมัก ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นตรวจสอบความเรียบร้อยของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ติดกับถังหมัก นำถังหมักไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำถังหมักมาต่อเข้ากับระบบของถังหมัก เปิดสวิทซ์ให้ระบบน้ำ โดยกำหนดสภาวะการกวนที่ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม ถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักปริมาตร 35 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรีย และเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

1.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย (Jeyasekaran et al., 2004)

เก็บตัวอย่างจากถังหมักทุก 2 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างจากการทดลองมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.85% Normal saline ผสมให้เข้ากัน เจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

1.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

1.3.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (Amylase; ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ, 2541; Anto et al., 2006)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ในถังหมัก จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำแป้งความเข้มข้น 1% (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสและคำนวณหาแอคติวิตีเอนไซม์

1.3.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Protease; ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ, 2541; Prakasham et al., 2006)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ในถังหมัก จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว

รอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม Casein 10% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloacetic acid ที่มี 0.22 โมลาร์ Sodium acetate และ 0.33 โมลาร์ Acetic acid และเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 5 นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีนและคำนวณหาแอคติวิตีเอนไซม์

1.3.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase; ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ, 2541) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ในถังหมัก จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Olive oil 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอะซิโตน : แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน NaOH 0.05 นอร์มอล โดยใช้ Phenolphthalein เป็น Indicator นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณ Oleic acid และแอคติวิตีเอนไซม์

2. การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* (Partial *Bacillus licheniformis* bioactive compound: PBL) ในการควบคุมแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

2.1 การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพร-ไบโอติก *Bacillus licheniformis* (Partial *Bacillus licheniformis* bioactive compound: PBL) (Ahern et al., 2003)

นำแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* มาขีด (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 จากนั้นเติมสารละลาย Ammonium sulfate ครั้งละ 10 กรัม เป็นระยะเวลา 3 นาที จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 484.54 กรัมต่อลิตร โดยทำการคนต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บส่วนที่ตกตะกอนและละลายในสารละลาย Sodium phosphate

buffer (0.05 M; pH 7) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

2.2 การออกแบบการทดลองในการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* (Partial *Bacillus licheniformis* bioactive compound: PBL)

2.2.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

ตัดผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2 x 2 เซนติเมตร และแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

ชุดที่ 1 ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป + น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 2 ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป + ไนซิน ความเข้มข้น 1000 IU/ml

ชุดที่ 3 ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป + สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis*

ชุดที่ 4 ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป + ไนซิน ความเข้มข้น 1000 IU/ml และเติมไนซินทุก ๆ 2 สัปดาห์

ชุดที่ 5 ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป + สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* และเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ทุก ๆ 2 สัปดาห์

เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow biological safety cabinet เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเก็บรักษาในถุงพลาสติก แล้วนำมาทำการศึกษาถึงการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายใต้ 2 สภาวะ คือ 1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 2) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกตอนกลางวันและปิดถุงพลาสติกตอนกลางคืน นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด เป็นระยะประมาณ 1 เดือน

2.2.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) (Jeyasekaran et al., 2004)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

2.2.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

ทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ทนต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* โดยนำแบคทีเรียที่ทนต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้น ตามวิธีการของ Branner (1984), Sneath et al. (1986) และ Holt et al. (1994)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมัก เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* และการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1. การศึกษาการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมักและการเจริญ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส

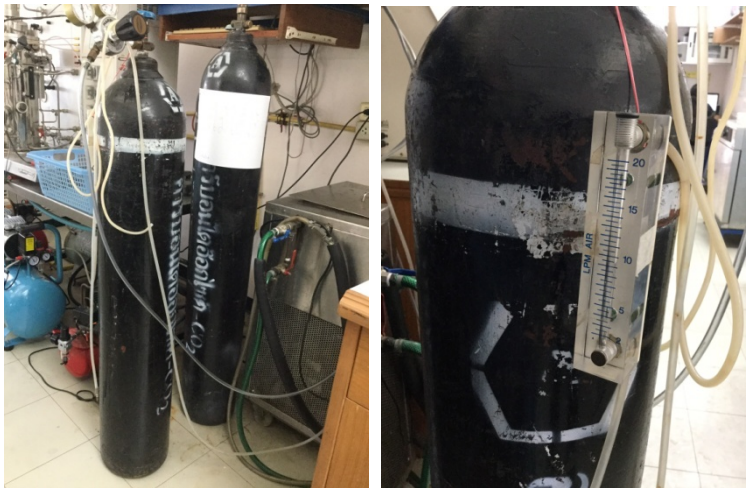
จากผลการทดลองการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกตามผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของโครงการวิจัยเรื่อง “สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี” ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผลการทดลองพบว่าสับสเตรทและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* คือ รำข้าว ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 โดยมีการเติม 1% (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ 35 องศาเซลเซียส

จากนั้นได้ทำการศึกษาถึงการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมักและสภาวะที่เหมาะสมดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 1 และปรับสภาวะให้เหมาะสม จากนั้นปรับอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที (อุปกรณ์ดังแสดงในภาพที่ 2-4) โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธีเกลี่ยเชื้อด้วยวิธี Spread plate (ดังแสดงในภาพที่ 5) และทำ Growth curve ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 6

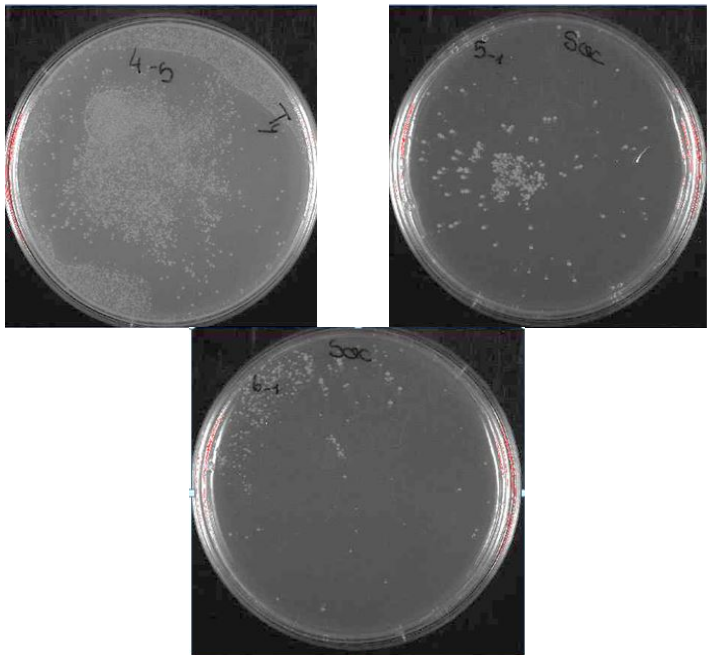
ภาพที่ 1 ถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร

ภาพที่ 2 เครื่องควบคุม

ภาพที่ 3 เครื่องควบคุมระบบน้ำ



ภาพที่ 4 ถังบรรจุอากาศ



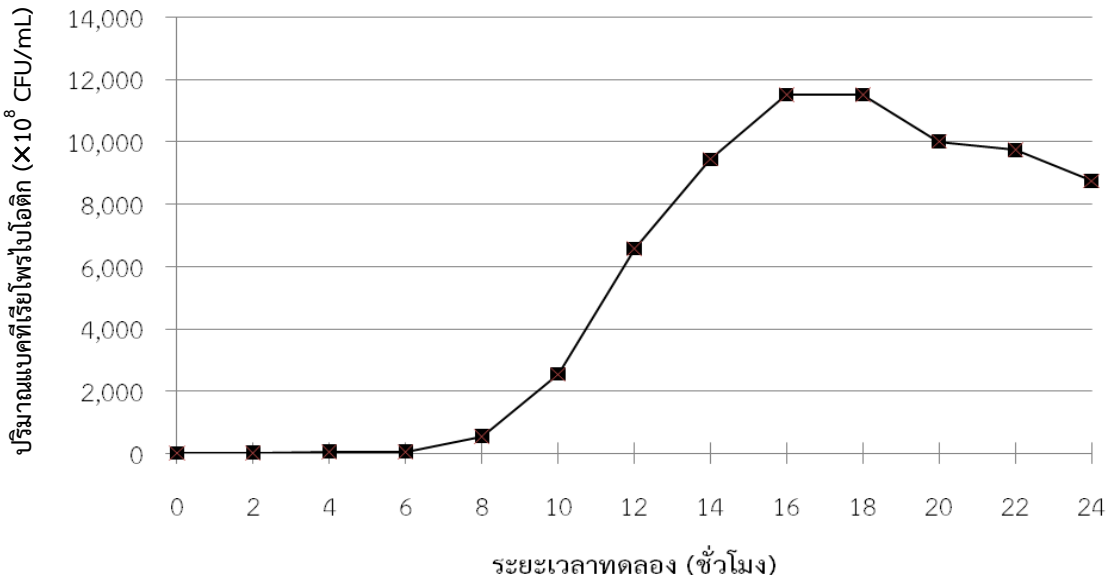
ภาพที่ 5 วัดการเจริญโดยวิธีเกลี่ยเชื้อด้วยวิธี Spread plate

1.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 มีการเติม 1 % (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *B. licheniformis* มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 16 และ 18 ชั่วโมง โดยพบปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.15\pm0.01 \times 10^{12}$ CFU/mL ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 6

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/mL)
ชั่วโมงที่ 0	$7.50\pm0.71 \times 10^{8}$
ชั่วโมงที่ 2	$8.50\pm0.71 \times 10^{8}$
ชั่วโมงที่ 4	$4.93\pm0.97 \times 10^{9}$
ชั่วโมงที่ 6	$6.00\pm1.00 \times 10^{9}$
ชั่วโมงที่ 8	$5.50\pm0.10 \times 10^{10}$
ชั่วโมงที่ 10	$2.53\pm0.21 \times 10^{10}$
ชั่วโมงที่ 12	$6.57\pm0.05 \times 10^{10}$
ชั่วโมงที่ 14	$9.43\pm0.21 \times 10^{10}$
ชั่วโมงที่ 16	$1.15\pm0.01 \times 10^{12}$
ชั่วโมงที่ 18	$1.15\pm0.02 \times 10^{12}$
ชั่วโมงที่ 20	$1.00\pm0.01 \times 10^{12}$
ชั่วโมงที่ 22	$9.73\pm0.15 \times 10^{10}$
ชั่วโมงที่ 24	$8.73\pm0.21 \times 10^{10}$



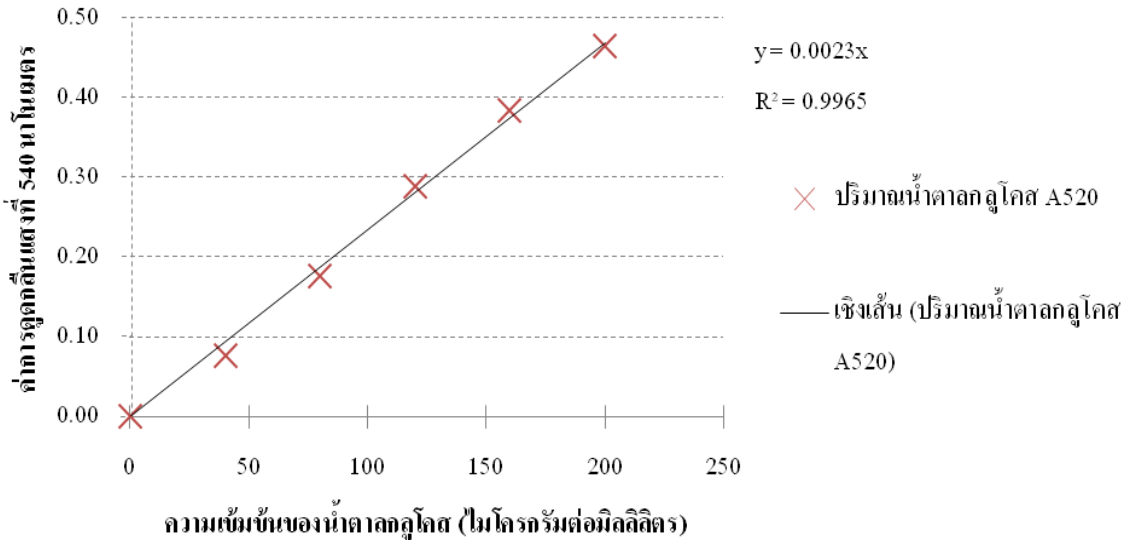
ภาพที่ 6 การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

จากการศึกษากิจกรรมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยทำกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส สารละลายไทโรซีน และกรดโอเลอิค ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-5 และภาพที่ 7-9

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

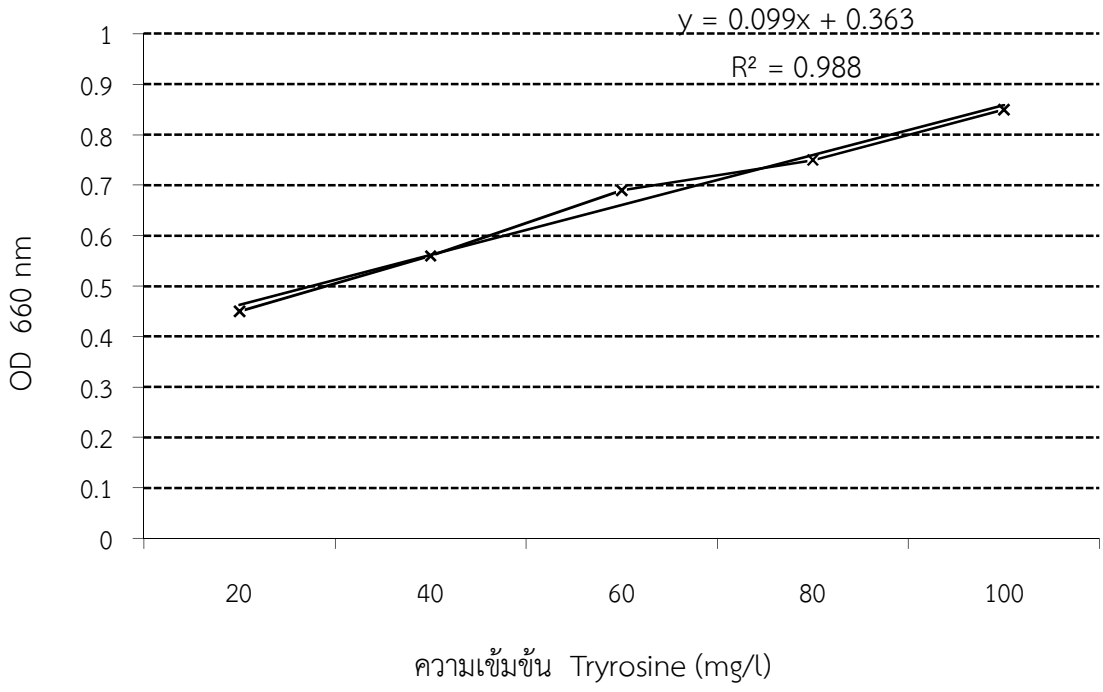
Glucose conc. (ug/mL)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส A520		
	1	2	ค่าเฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000
40	0.075	0.078	0.077
80	0.174	0.178	0.176
120	0.271	0.306	0.289
160	0.367	0.400	0.384
200	0.438	0.492	0.465



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงความเข้มข้นของไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

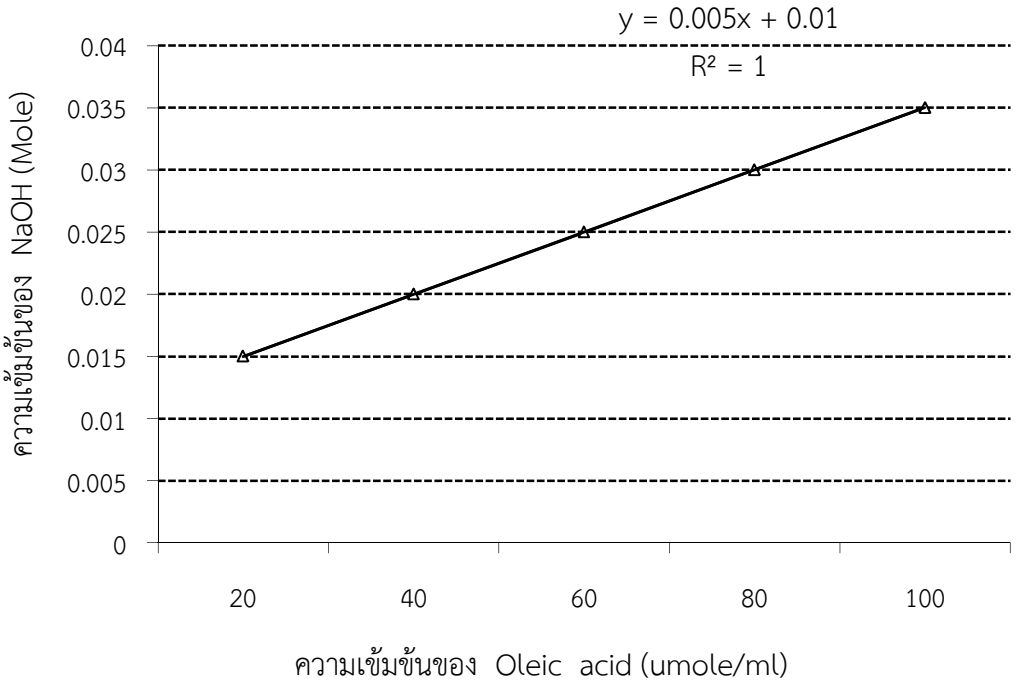
ความเข้มข้นของไทโรซีน (mg/l)	**OD_{660}**
20	0.45
40	0.56
60	0.69
80	0.75
100	0.85



ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐานสารละลายไทโรซีน

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงความเข้มข้นของกรดโอเลอิกและปริมาณ NaOH

ความเข้มข้นของ Oleic acid (µmole/mL)	**ปริมาตร NaOH (mL)**	**ความเข้มข้น NaOH (Mole)**
20	0.015	0.015
40	0.020	0.020
60	0.025	0.025
80	0.030	0.030
100	0.035	0.035



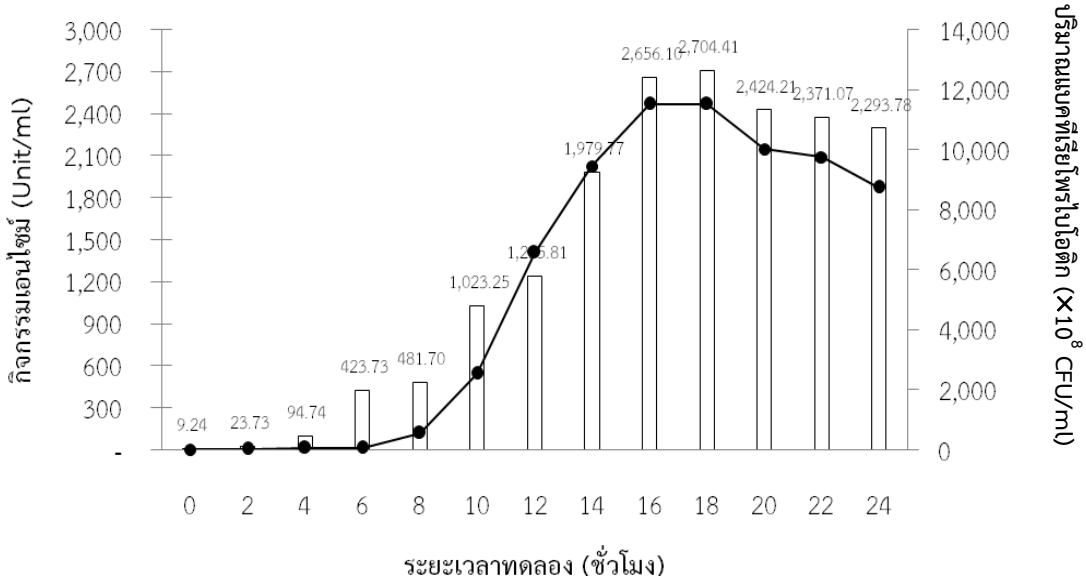
ภาพที่ 9 กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

และต่อมาทำการทดสอบถึงปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ควบคู่กับการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด รองลงมาคือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก และมีกิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 2704.41 Unit/mL และเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 2293.78 Unit/mL ส่วนกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสพบว่ามีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16-18

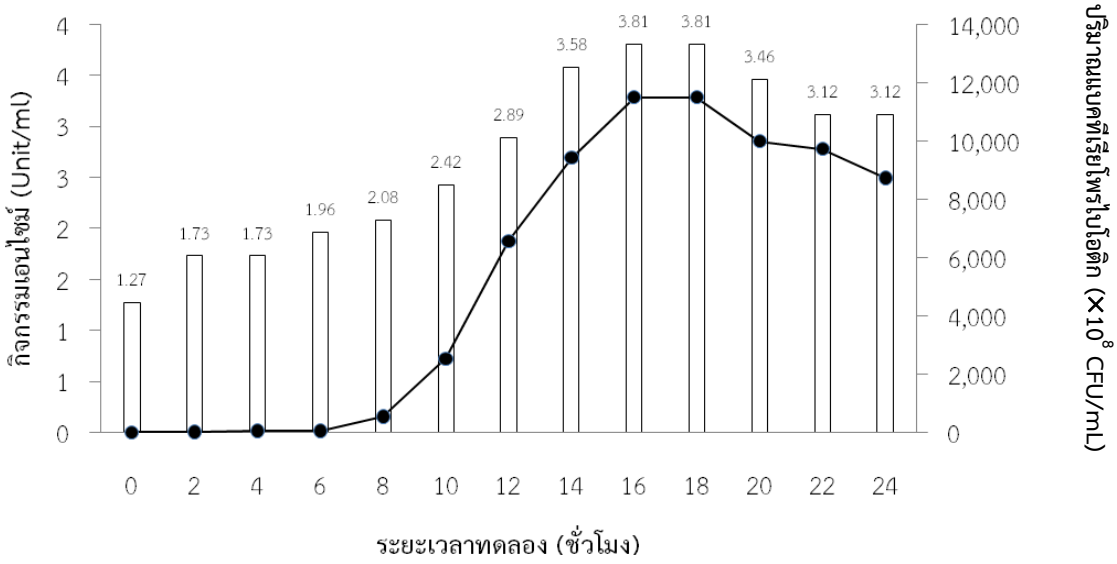
เท่ากับ 3.81 Unit/mL ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.33 Unit/mL ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 10-12

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

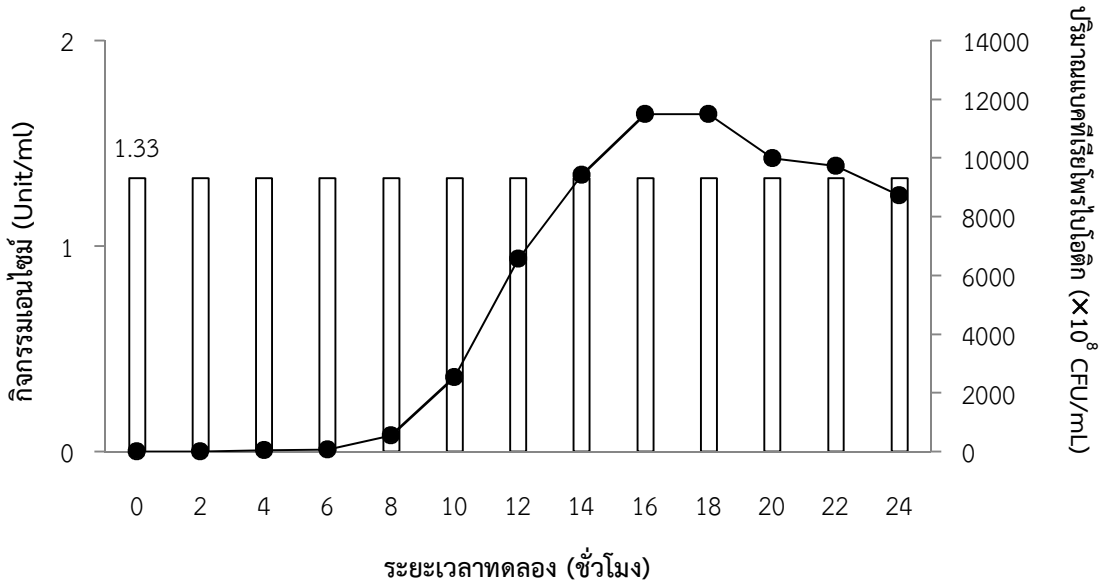
ระยะเวลาทดลอง	กิจกรรมของเอนไซม์ (Unit/mL)		
	อะไมเลส	โปรติเอส	ไลเปส
ชั่วโมงที่ 0	9.24	1.27	1.33
ชั่วโมงที่ 2	23.73	1.73	1.33
ชั่วโมงที่ 4	94.74	1.73	1.33
ชั่วโมงที่ 6	423.73	1.96	1.33
ชั่วโมงที่ 8	481.70	2.08	1.33
ชั่วโมงที่ 10	1023.25	2.42	1.33
ชั่วโมงที่ 12	1235.81	2.89	1.33
ชั่วโมงที่ 14	1979.77	3.58	1.33
ชั่วโมงที่ 16	2656.10	3.81	1.33
ชั่วโมงที่ 18	2704.41	3.81	1.33
ชั่วโมงที่ 20	2424.21	3.46	1.33
ชั่วโมงที่ 22	2371.07	3.12	1.33
ชั่วโมงที่ 24	2293.78	3.12	1.33



ภาพที่ 10 การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 11 การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

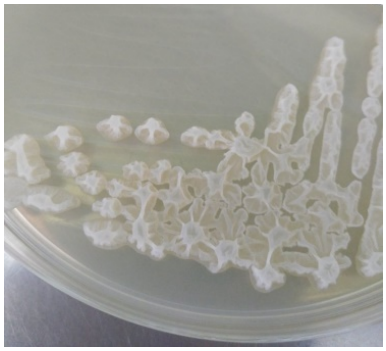


ภาพที่ 12 การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* (Partial *Bacillus licheniformis* bioactive compound: PBL) ในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

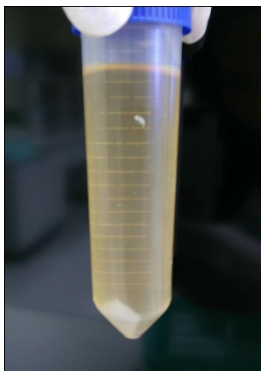
2.1 การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis*

การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* แสดงดังภาพที่ 13-21



ภาพที่ 13 โคโลนีของ *Bacillus licheniformis* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar

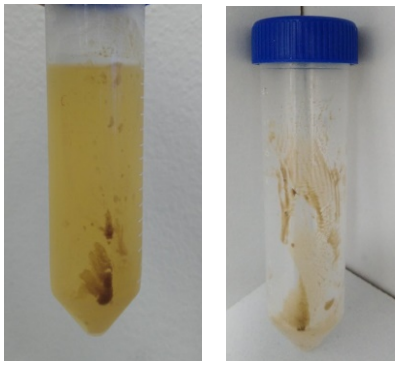
ภาพที่ 14 *Bacillus licheniformis* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth



ภาพที่ 15 ตะกอนเซลล์หลังจากการปั่นเหวี่ยง

ภาพที่ 16 ส่วนใสที่ผ่านการกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

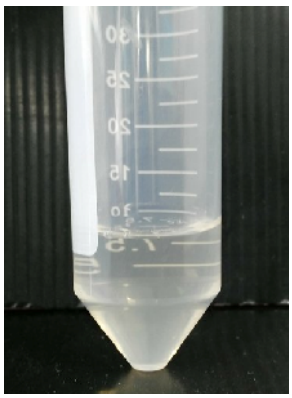
ภาพที่ 17 สารที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ภาพที่ 18 ตะกอนเซลล์หลังจากการปั่นเหวี่ยง

ภาพที่ 19 ตะกอนเซลล์ที่ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M, pH 7.0)

ภาพที่ 20 การกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยวิธีไดอะไลซิส



ภาพที่ 21 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis*

2.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ผลการทดลองแสดงพบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมไนซิน ความเข้มข้น 1,000 IU/mL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้ดีที่สุดเท่ากับ 75.94 % รองลงมาคือ การเติมสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน และการเติมไนซินความเข้มข้น 1,000 IU/mL ทุกๆ 2 สัปดาห์ เท่ากับ 44.70 % และ 3.08 %

ตารางที่ 7 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (CFU/g)

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)				
	น้ำกลั่น	ไนซิน 1,000 IU/mL	PBL	ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)	PBL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)
15 นาที	$7.30\pm1.16\times10^{3\ a,3}$	$2.61\pm1.20\times10^{3\ bc,1}$	$5.50\pm1.55\times10^{3\ a,2}$	$2.66\pm1.81\times10^{3\ b,1}$	$5.96\pm1.93\times10^{3\ a,23}$
1	$9.02\pm0.87\times10^{3\ b,3}$	$1.64\pm0.90\times10^{3\ a,1}$	$7.74\pm2.47\times10^{3\ b,3}$	$5.12\pm1.04\times10^{3\ c,2}$	$7.70\pm1.48\times10^{3\ ab,3}$
7	$9.00\pm1.11\times10^{3\ b,2}$	$3.20\pm1.12\times10^{3\ cd,1}$	$1.17\pm0.15\times10^{4\ c,3}$	$3.33\pm1.16\times10^{3\ b,1}$	$1.16\pm0.21\times10^{4\ c,3}$
14	$1.08\pm0.18\times10^{4\ c,3}$	$1.53\pm0.33\times10^{3\ a,1}$	$1.22\pm0.18\times10^{4\ c,4}$	$7.75\pm2.22\times10^{2\ a,1}$	$8.06\pm1.25\times10^{3\ b,2}$
21	$8.53\pm1.25\times10^{3\ b,4}$	$1.98\pm1.12\times10^{3\ ab,2}$	$7.30\pm1.44\times10^{3\ b,3}$	$5.89\pm2.42\times10^{2\ a,1}$	$8.91\pm0.40\times10^{3\ b,4}$
28	$8.70\pm0.45\times10^{3\ b,5}$	$3.83\pm0.46\times10^{3\ d,2}$	$6.08\pm1.52\times10^{3\ ab,3}$	$6.40\pm2.07\times10^{2\ a,1}$	$7.96\pm2.98\times10^{3\ b,4}$
% การลดลง	-19.18	-46.74	-10.55	75.94	-33.56

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

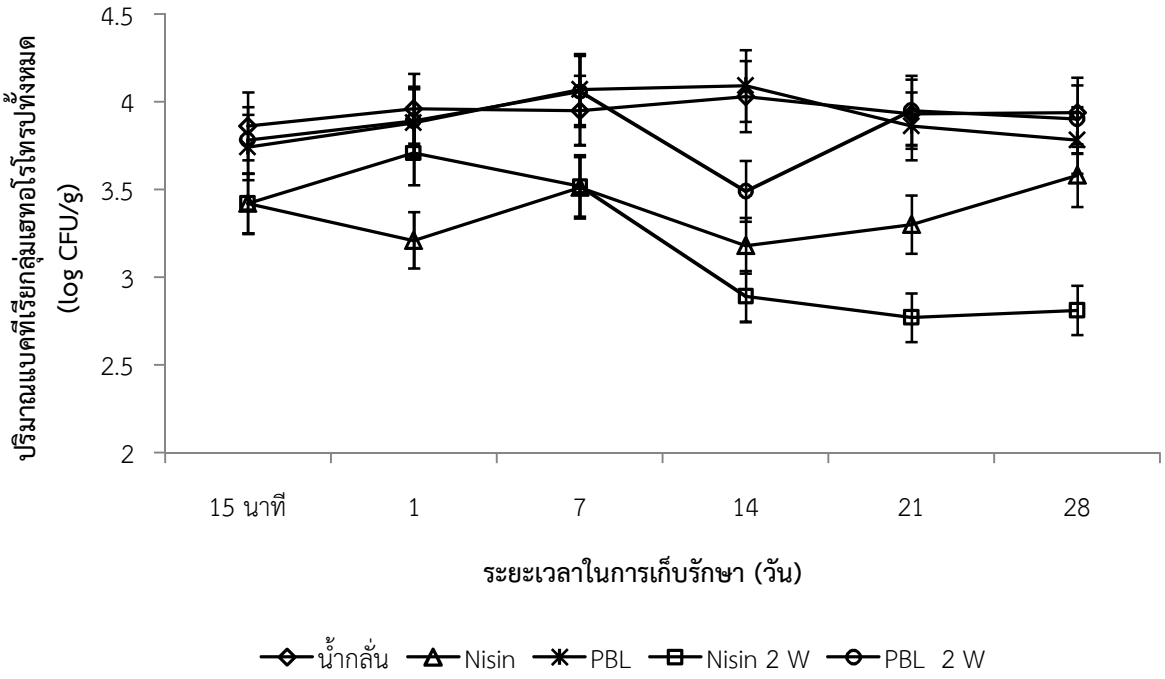
ตารางที่ 8 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (CFU/g)

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)				
	น้ำกลั่น	ไนซิน 1,000 IU/mL	PBL	ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)	PBL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)
15 นาที	$7.89\pm0.88\times10^{3\ a,3}$	$2.61\pm1.16\times10^{3\ a,1}$	$6.04\pm1.11\times10^{3\ a,2}$	$2.27\pm0.43\times10^{3\ b,1}$	$5.66\pm2.40\times10^{3\ b,2}$
1	$8.63\pm1.74\times10^{3\ ab,3}$	$2.94\pm0.77\times10^{3a,1}$	$7.95\pm1.43\times10^{3\ b,3}$	$2.81\pm1.04\times10^{3\ c,1}$	$4.13\pm0.52\times10^{3\ a,2}$
7	$1.03\pm0.36\times10^{4\ bc,3}$	$2.93\pm1.01\times10^{3a,1}$	$5.31\pm1.90\times10^{3\ a,2}$	$2.57\pm0.72\times10^{3\ bc,1}$	$5.68\pm1.01\times10^{3\ b,2}$
14	$1.12\pm0.31\times10^{4\ c,4}$	$2.91\pm0.48\times10^{3a,2}$	$6.11\pm1.50\times10^{3\ a,3}$	$9.00\pm2.73\times10^{2a,1}$	$6.62\pm0.45\times10^{3\ b,3}$
21	$9.83\pm0.86\times10^{3\ abc,4}$	$2.83\pm1.06\times10^{3a,2}$	$5.48\pm0.75\times10^{3\ a,3}$	$9.44\pm2.51\times10^{2a,1}$	$3.37\pm0.99\times10^{3\ a,2}$
28	$9.89\pm1.20\times10^{3\ abc,4}$	$8.82\pm1.48\times10^{3\ b,3}$	$9.02\pm0.86\times10^{3\ b,3}$	$2.20\pm0.56\times10^{3\ b,1}$	$3.13\pm0.31\times10^{3\ a,2}$
% การลดลง	-25.35	-237.93	-49.34	3.08	44.70

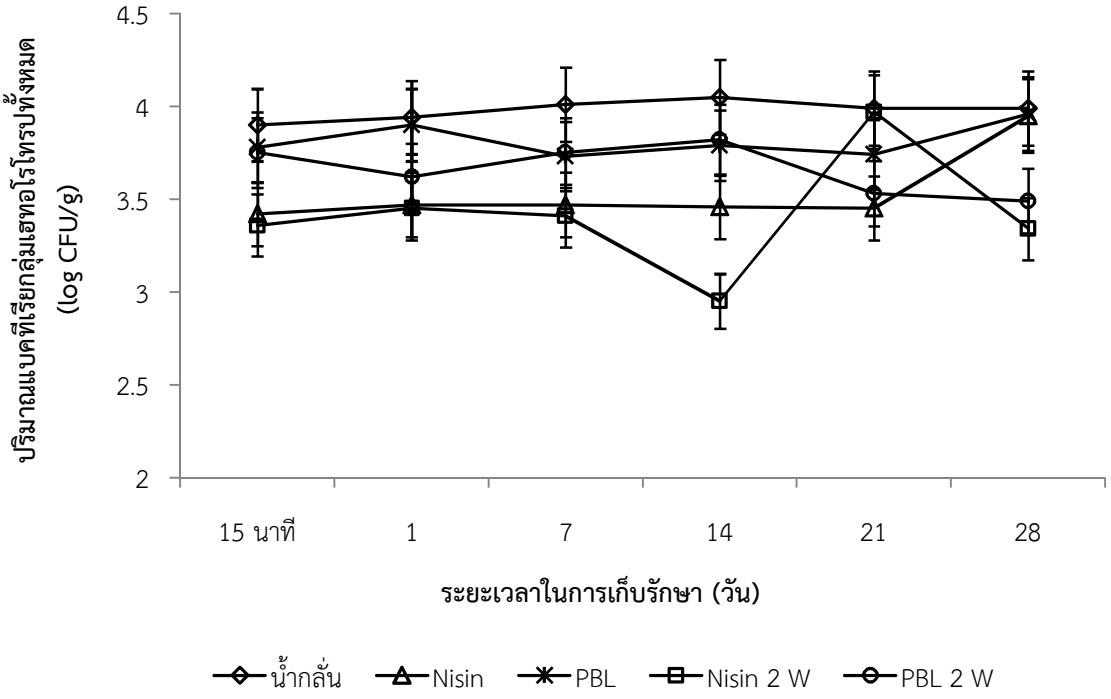
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (CFU/g)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การลดลง	
	การเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	การเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน
น้ำกลั่น	-19.18	-25.35
ไนซิน 1,000 IU/mL	-46.74	-237.93
PBL	-10.55	-49.34
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)	75.94	3.08
PBL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)	-33.56	44.70



ภาพที่ 22 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (CFU/g)



ภาพที่ 23 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาหมึกแปรรูปโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (CFU/g)

จากการศึกษาพบว่าภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อมีการเติมน้ำกลั่นพบว่า ชุดนี้มีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus*, *Bacillus firmus*, *B. pantothenticus*, *B. laterosporus*, *B. marinus*, *B. coagulans* และ *B. circulan* ตลอด 28 วันของการทดลอง ส่น *B. brevis* พบภายใน 1 วัน ของการทดลองเท่านั้น ชุดการทดลองที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 1,000 IU/mL พบว่าตลอดการทดลองไม่สามารถตรวจพบ *B. brevis* และไม่พบ *B. marinus* หลังจากเติมสารไนซินเพียง15 นาที แต่กลับมาตรวจพบในวันที่ 1-28 ของการศึกษา ส่วนแบคทีเรียอีก 6 ชนิด พบว่ามีการปนเปื้อนตลอดระยะเวลาการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติม PBL พบว่าไม่พบการปนเปื้อนของ *B. brevis* ภายในวันที่ 1-28 ของการศึกษา และไม่พบการปนเปื้อนของ *S. capitis* subsp. *urealyticus* และ *B. coagulans* ในวันที่ 28 และ 1 ของการทดลอง ตามลำดับ ส่วน *B. firmus*, *B. pantothenticus*, *B. laterosporus*, *B. marinus*, *B. circulan* คงพบได้ตลอดการทดลอง ชุดการทดลองที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 1,000 IU/mL ทุกๆ 2 สัปดาห์พบว่า สามารถกำจัด *B. marinus* เพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และ 28 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเพียง 1 ครั้ง นอกจากนั้นพบว่าชุดที่มีการเติม PBL ทุกๆ 2 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนได้ดีขึ้น คือ ยังคงกำจัด *B. brevis* ได้ตั้งแต่วันที่ 1-28 และเพิ่ม

ความสามารถในการกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ตั้งแต่วันที่ 7-28 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 10

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า การเติม PBL ทุกๆ 2 สัปดาห์ ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการกำจัดชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการทดลอง (วัน) / ชนิดของแบคทีเรีย	ชุดการทดลอง																	
	น้ำกลั่น						ไนซิน 1,000 IU/mL						PBL					
	15 นาที	1	7	14	21	28	15 นาที	1	7	14	21	28	15 นาที	1	7	14	21	28
Family Micrococcaceae																		
Staphylococcus capitis subsp. *urealyticus*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Family Bacillaceae																		
Bacillus firmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus pantothenticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus brevis	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Bacillus marinus	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus coagulans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Bacillus circulan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง พบ ; - หมายถึง ไม่พบ

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ต่อ)

ระยะเวลาการทดลอง (วัน) / ชนิดของแบคทีเรีย	ชุดการทดลอง											
	ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)						PBL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)					
	15 นาที	1	7	14	21	28	15 นาที	1	7	14	21	28
Family Micrococcaceae												
Staphylococcus capitis subsp. *urealyticus*	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Family Bacillaceae												
Bacillus firmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus pantothenticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus brevis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Bacillus marinus	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Bacillus coagulans	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Bacillus circulan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง พบ ; - หมายถึง ไม่พบ

ส่วนผลของสารชนิดต่าง ๆ ที่เติมลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนต่อชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ในชุดการทดลองที่มีการเติมน้ำกลั่นพบว่า สามารถกำจัดการปนเปื้อน *B. brevis* ได้ตั้งแต่วันที่ 1-28 ของการทดลอง ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถกำจัดการปนเปื้อน *B. brevis* ได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สามารถกำจัด *B. brevis* ตั้งแต่วันที่ 7-28 ของการทดลอง) และยังคงพบการปนเปื้อนแบคทีเรียอีก 7 ชนิด ได้ตลอดการทดลองเช่นเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 1,000 IU/mL ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน มีความสามารถในการกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ได้ในวันที่ 7 และ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่สามารถกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ได้เลยตลอดการทดลอง 28 วัน ชุดการทดลองที่เติม PBL ภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน มีความสามารถกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ได้รวดเร็วกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 7 วันของการทดลอง รวมทั้งสามารถกำจัด *B. brevis* ได้ตลอดการทดลอง ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สามารถกำจัดภายใน 1-28 วันของการศึกษา นอกจากนั้นชุดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 1,000 IU/mL ทุกๆ 2 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน พบว่าสามารถกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ในวันที่ 21-28 เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเพียง 1 ครั้งที่ไม่สามารถกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ได้เลยตลอดการทดลอง นอกจากนั้นพบว่าชุดที่มีการเติม PBL ทุกๆ 2 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน พบว่าสามารถกำจัด *B. brevis* ได้ตลอดการทดลอง ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถกำจัดได้ ณ วันที่ 1-28 ของการทดลอง

ตารางที่ 11 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน

ระยะเวลาการทดลอง (วัน) / ชนิดของแบคทีเรีย	ชุดการทดลอง																	
	น้ำกลั่น						ไนซิน 1,000 IU/mL						PBL					
	15 นาที	1	7	14	21	28	15 นาที	1	7	14	21	28	15 นาที	1	7	14	21	28
Family Micrococcaceae																		
Staphylococcus capitis subsp. *urealyticus*	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Family Bacillaceae																		
Bacillus firmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus pantothenticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus brevis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus marinus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus coagulans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus circulan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง พบ ; - หมายถึง ไม่พบ

ตารางที่ 11 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน (ต่อ)

ระยะเวลาการทดลอง (วัน) / ชนิดของแบคทีเรีย	ชุดการทดลอง											
	ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)						PBL (เติมทุกๆ 2 สัปดาห์)					
	15 นาที	1	7	14	21	28	15 นาที	1	7	14	21	28
Family Micrococcaceae												
Staphylococcus capitis subsp. *urealyticus*	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Family Bacillaceae												
Bacillus firmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus pantothenticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus brevis	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus marinus	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus coagulans	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Bacillus circulan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง พบ; - หมายถึง ไม่พบ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 มีการเติม 1 % (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกในถังหมักมีการเจริญสูงสุดตรวจวัดปริมาณเชื้อได้ $1.15\pm0.01\times10^{12}$ CFU/mL เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง และมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 เท่ากับ 2704.41 Unit/mL รองลงมาคือ เอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16-18 เท่ากับ 3.81 Unit/mL ส่วนเอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด เท่ากับ 1.33 Unit/mL ตลอดระยะเวลาการทดลอง

2. ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการเปรียบเทียบผลของการเติมสารต่าง ๆ และการเก็บภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป โดยผลการศึกษาพบว่าการเติมสาร PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้และมีประสิทธิภาพในการกำจัดชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้ดีที่สุด โดยการเก็บภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติม PBL เพียงครั้งเดียวและการเติม PBL ทุกๆ 2 สัปดาห์ มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากวันแรกของการทดลอง 10.55 % และ 33.56 % ในขณะที่การเก็บรักษาภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนพบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติม PBL เพียงครั้งเดียวมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเพิ่มขึ้น 49.34 % แต่ชุดการทดลองที่มีการเติม PBL ทุกๆ 2 สัปดาห์ มีปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลง 44.70 % ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การลดลงมากกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมไนซินที่ความเข้มข้น 1,000 IU ทุก ๆ 2 สัปดาห์ (3.08 %) ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้และมีประสิทธิภาพในการกำจัดชนิดแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปได้ดีที่สุด

3. จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถคาดว่าสาร PBL ร่วมกับสภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน น่าจะนำมาประยุกต์ใช้กับการใช้จริง เนื่องจากสภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนเป็นสภาวะที่มีการใช้จริงของผู้ประกอบการขายผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในประเทศไทยนั่นเอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมักและการเจริญ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส

จากการศึกษาในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาถึงชนิดและสภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารราคาถูกเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก รวมถึงศึกษาแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ผลการศึกษาพบว่าผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* สามารถคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50-96 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-10 และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติก คือ เปปซิน ทริปซิน และโปรติเนส เค โดยพบว่าชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสม ราคาถูก และหาง่าย จำนวน 2 ชนิด คือ รำข้าวและข้าวโพด พบว่ารำข้าวเป็นสับสเตรทที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการศึกษาครั้งนี้สูงสุด และต่อมาทำจากการศึกษาถึงสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* คือการเพาะเลี้ยงโดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเติม 1 % (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าสับสเตรทและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* คือ รำข้าวเป็นสับสเตรทที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 โดยมีการเติม 1 % (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงการขยายขนาดของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ด้วยวัสดุราคาถูกในถังหมักและสภาวะที่เหมาะสมดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร และปรับสภาวะให้เหมาะสม จากนั้นปรับอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตลอดระยะเวลาการศึกษาทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวัดการเจริญโดยวิธีเกลี่ยเชื้อด้วยวิธี Spread plate และทำ Growth curve ผลการทดลองพบว่า *B. licheniformis* มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 16 และ 18 ชั่วโมง โดยพบปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.15\pm0.01 \times 10^{12}$ CFU/mL

เมื่อทำการศึกษากิจกรรมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* โดยวิธีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ การผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ควบคู่กับการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าแบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด รองลงมาคือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก และมีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 2704.41 Unit/mL และเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 2293.78 Unit/mL ส่วนกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสพบว่ามีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16-18 เท่ากับ 3.81 Unit/mL ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.33 Unit/mL จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในถังหมักพบว่า แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) ที่ 8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งมีการเจริญสูงสุด ตรวจวัดปริมาณเชื้อได้ $1.15\pm0.01x10^{12}$ CFU/mL เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 และ 18 ชั่วโมง โดยมีการใช้อัตราการให้อากาศที่สอดคล้องกับรายงานของ Stanbury and Whitaker (1984) กล่าวว่าอัตราการให้อากาศที่ใช้ในกระบวนการหมักควรอยู่ในช่วง 0.5-1.5 vvm การให้อากาศที่เหมาะสมถือเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงซึ่งอัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารมีผลต่อการเจริญและการผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรีย (Dey et al., 2016) การศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ในถังหมักที่ศึกษาโดย Sen and Babu (2005) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมวลเซลล์โดยเชื้อ *B. coagulans* RK-02 ในถังหมักขนาด 12 ลิตร คือ pH 6.65 อุณหภูมิ 38.3 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวน 247 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.05 vvm โดยสามารถผลิตมวลเชื้อได้ 4.3 กรัมต่อลิตร

2. การศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* (Partial *Bacillus licheniformis* bioactive compound: PBL) ในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารที่เติมลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนต่อชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด พบว่าในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปมีแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนเป็นจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus*, *Bacillus firmus*, *B. pantothenticus*, *B. laterosporus*, *B. brevis*, *B. marinus*, *B. coagulans* และ *B. circulan* ในทุกชุดการทดลอง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อนมากที่สุดคือ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* และอีกหนึ่งชนิดคือ *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* ซึ่ง *Bacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มชอบเค็มในระดับปานกลางและมักทำให้อาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5-20 เปอร์เซ็นต์ เน่าเสีย (Baross and Lenovich 1992; Sumague et al., 2008) และหมึกแปรรูปในการศึกษาครั้งนี้เป็นอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 2.87% (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2559)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ได้แก่ *B. brevis*, *B. laterosporus*, *B. marinus* และ *B. coagulans* (Barsby et al., 2002; Bashir et al., 2016; El Sayed et al., 2015; Rautenbach et al., 2007; Roh et al., 2010; Su and Xu, 2014; Xue et al., 2008; Yao, et al., 2016; Yokomizo et al., 2002; Zhang et al., 2010) และกลุ่มก่อโรค ได้แก่ *B. circulan* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด และถือเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Alebouyeh et al., 2011) *B. firmus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา (Vasant et al., 2013) *B. pantothenticus* เป็น

สาเหตุของโรคเป็นฝีที่ตับและติดเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา Cefotaxime และ Netilmicin ตามด้วย Ciprofloxacin (Na et al., 2009) ส่วน *S. capitis* subsp. *urealyticus* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ติดเชื้อที่เยื่อบุหัวใจ และการติดเชื้อในกระแสเลือดในทารกแรกเกิด (Martins Simoes et al., 2013; Oud, 2011; Rasigade et al., 2012; Takano, 2011)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เติมด้วยสารไนซิน 1,000 IU/mL และเติมทุก ๆ 2 สัปดาห์ มีการลดลงของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 75.94 % แต่ไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคชนิด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ได้ตลอดการศึกษา 28 วัน แต่ในขณะที่การเติม PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ไม่สามารถลดปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แต่เพิ่มขึ้นจาก $5.96\pm1.93\times10^{3}$ CFU/g เป็น $7.96\pm2.98\times10^{3}$ CFU/g แต่สามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคชนิด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ได้ภายใน 7 วันของการศึกษา ดังนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบแล้วพบว่าการเติมสาร PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน และมีการเติมสาร PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นสภาวะที่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้มากที่สุดคือ 44.70% รวมทั้งกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคดังที่ได้กล่าวมาแล้วได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถกำจัดได้ภายใน 7 วันของการเก็บรักษา ในขณะที่ชุดที่เติมไนซิน 1,000 IU/mL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่สามารถลดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ 3.08% และสามารถกำจัด *S. capitis* subsp. *urealyticus* ภายใน 21 วันของการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าสาร PBL มีความสามารถในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปภายใต้ 2 สภาวะที่เป็นการเก็บรักษาในทางปฏิบัติจริงของคนขายผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปในประเทศไทย จากการรายงานพบว่าสารต้านแบคทีเรียที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยกตัวอย่างเช่น Kayalvizhi and Gunasekaran (2010) รายงานถึง *B. licheniformis* MKU3 ผลิตสารกลุ่ม Bacteriocin-like peptide ที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกชนิดต่าง ๆ และ *E. coli* DH5x และ Shobharani et al. (2015) พบว่าส่วนใสปราศจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยง *B. licheniformis* strain MCC2512 มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Klebsiella* sp., *Aeromonas hydrophila* และ *Listeria monocytogenes* รวมทั้ง Rey et al. (2004) รายงานถึง *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมหลายด้าน ยกตัวอย่างเช่น เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ ยาปฏิชีวนะและสารต้านแบคทีเรีย เป็นต้น นอกจากนั้นพบว่าภายใต้สภาวะการเปิดปิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ แต่พบว่าสาร PBL มีประสิทธิภาพสูงสุดและสูงกว่าสารไนซิน เนื่องจากสารต้านแบคทีเรียที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีความคงทนต่ออุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารไนซิน (Kayalvizhi and Gunasekaran, 2008; Teixeira et al., 2009)

ดังนั้นสาร PBL จากการศึกษาครั้งนี้น่าจะเป็นสารที่น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในประเทศไทยในขณะวางขาย โดยทำให้ปราศจากการเติมสารกันเสียซึ่งเป็นสารแต่งเติมทางเคมี แต่มีการใช้ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติจากแบคทีเรีย และทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยปราศจากเชื้อก่อโรคและมีปริมาณแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียมีปริมาณต่ำ นอกจากนั้นพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* เป็นสารที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Chen et al., 2008) ต้านอนุมูลอิสระ (Asker et al., 2009) รักษาบาดแผล (Rasulov et al., 1993) การควบคุมน้ำตาลกลูโคสในเลือด (Cho et al., 2007) และการป้องกันแสงยูวี (Wang et al., 2007) รวมทั้งด้านอื่น ๆ อีกหลายด้าน และจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในประเทศไทยน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมาตรฐานระดับโลกร่วมกับมีสารเสริมสุขภาพดังที่ได้กล่าวไปแล้ว และทีมงานจะดำเนินการศึกษาด้านฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ รักษาบาดแผล การควบคุมน้ำตาลกลูโคสในเลือด และการป้องกันแสงยูวี รวมทั้งด้านอื่น ๆ อีกหลายด้าน นอกเหนือจากการนำมาควบคุมเฉพาะมาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งจะนำมาสู่ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในประเทศไทยที่มีมาตรฐานและมีคุณสมบัติที่พิเศษนำมาสู่เศรษฐกิจที่ยั่งยืนในอุตสาหกรรมด้านนี้และสามารถเป็นครัวโลกในอุตสาหกรรมด้านนี้ของประเทศไทย และสามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้อย่างเข้มแข็งซึ่งคาดการณ์ออกมาประโยชน์ในการลดค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในประเทศไทยที่มีเชื้อก่อโรคปะปนและเพิ่มมูลค่าของสินค้าทางด้านผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในประเทศไทยได้อย่างมหาศาลนั่นเอง

เอกสารอ้างอิง

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโภค. (2541). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาเคมีและจุลชีววิทยาของอาหาร. (2539). *เคมีและจุลชีววิทยาของอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). นนทบุรี: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*, 1(1), 59-70.

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

ดนุวัต เพ็งอ้น, ภัทธนาวรรณ์ พรมนิ่ม และสุชัญญา อรุณรุ่งโรจน์. (2551). การแยกและคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อใช้ในปลา. ใน *รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2551* (หน้า 435-443). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นิตยา ลิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อารีย์ชน, ชุมพล ศรีทอง และนิติ ชูเชิด. (2549). การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอ-ติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44* (หน้า 214-228). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัญญัติ บุญญา. (2546). *แนวปฏิบัติและการปะยุกต์ใช้เรื่องความปลอดภัยของอาหาร*. กรุงเทพฯ: เอ. อาร์. บิซิเนส เพรส.

บัญญัติ สุขศรีงาม, นิสา ไกรรักษ์, พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล, ศิริพร เอื้ออังกูร, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, อภิรดี ปิลันธนภาคย์, กาญจนา หริ่มเพ็ง, ปริยา นุพาสันต์, ศิริโฉม ทุ่งเก้า, สุดสายชล หอมทอง, สุดารัตน์ สวนจิตร และวรนาฎ จงโยธา. (2551). *สถานการณ์การปนเปื้อนและพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแห้งเพื่อมุ่งสู่การเป็นศูนย์ตรวจจุลินทรีย์และการรับรองมาตรฐานสินค้าอาหารทะเลแห้ง*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

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

ประสงค์ เทียนบุญ (2553). บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. *วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ* (วคอภ), *4*(2), 69-76.

ภัทรชัย กีรติสิน (2549). *ตำราแบคทีเรียการแพทย์*. กรุงเทพฯ: วี. เจ. พริ้นติ้ง

ภาควิชาจุลชีววิทยา (2531). *เภสัชจุลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: อักษรบัณฑิต.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. (2548). *ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชฎาวรรณ เดชมณี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2548). การศึกษาลักษณะบางประการของสาร Secondary metabolites ที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. glycines. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43* (หน้า 313-320). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). *จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

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

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

ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2546). *จุลชีววิทยาทางอาหาร 1 (เฉพาะปฏิบัติการ)*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. (2544). *วิศวกรรมเคมีชีวเคมี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุดารัตน์ บุญยง. (2548). สารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของ กรมศุลกากร. (2557). *สถิติการส่งออก*. วันที่ค้นข้อมูล 28 สิงหาคม 2557 เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, เทวินทร์ แสนเสนยา, น้ำผึ้ง บุตรโคตร, พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2557) ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารทะเลแห้ง. ใน *การประชุมวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 10* มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรียพร ทองเนียม. (2553ก). การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*, *2*(1), 70-84.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรียพร ทองเนียม. (2553ข). แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.*, *38*(4), 509-519.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสวามินี ธีระวุฒิ. (2554). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554. ชลบุรี.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, อรสา สุริยาพันธ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2559). *สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558.

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

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

โสภณ คงสำราญ, เชิดศักดิ์ ธีระบุตร, นงนุช ศรีปฐมสวัสดิ์, เผดียง พลางกูร, พจนีย์ โกมลภิส, สมพร ศรียศชาติ, หวานจิตต์ เกรันพงษ์, อมรรัตน์ ลีลาภรณ์ และอิทธิพันธ์ เจริญผล. (2524). *แบคทีเรียทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ: โครงการตำราศิริราช.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. (2553). *แบคทีเรียทางการแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

Ahern, M., Verschueren, S., and van Sinderen, D. (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology Letters*, *220*, 127-131.

Alebouyeh, M., Gooran Orimi, P., Azimi-rad, M., Tajbakhsh, M.,Tajeddin, E., Jahani Sherafat, S., Nazemalhosseini mojarad, E., and Zali, M.R. (2011). Fatal sepsis by *Bacillus circulans* in an immunocompromised patient. *Iranian Journal of Microbiology*, *3*(3), 156-158.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 7915-7922.

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.

Anto, H., Trivedi, U., and Patel, K. (2006). Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technology Biotechnology*, *44* (2), 241-245.

Asker, M. M. S., Ahmed, Y. M., and Ramadan, M. F. (2009). Chemical characteristics and antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Microbacterium terregens*. *Carbohyd. Polym.*, *77*, 563-567.

Baross, J., and Lenovich, L.M. (1992). Halophilic and osmophilic microorganisms. In Vanderzant, C. and Splittoesser, D.F. (eds.), *Compedium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 199-223). Washington D.C: American Public Health Association.

Barsby, T., Kelly M.T., Andersen, R.J. (2002). Tupuseleiamides and Basiliskamides, New Acyldipeptides and Antifungal Polyketides Produced in Culture by a *Bacillus laterosporus* Isolate Obtained from a Tropical Marine Habitat. *J. Nat. Prod*, *65* (10), 1447–1451.

Bashir, F., Aslam, S., Khan, R.A., and Shahzadi, R. (2016). Larvicidal Activity of *Bacillus laterosporus* Against Mosquitoes. *Pakistan J. Zool*, *48*(1), 281-284.

Benerjee, S., Devaraja, T.N., Shariff, M., and Yusoff, F.M. (2007). Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia* sp.. *Journal of Fish Diseases*, *30*, 383-389.

Branner, D.J. (1984). Section: 5 Facultative anaerobic Gram-negative rods. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Volume 1 (pp. 414-417). Baltimore: Williams & Wilkins

Chen, W., Zhao, Z., Chen, S. F., and Li, Y. Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresource Technol*., *99*, 3187- 3194.

Cho, E. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Oh, J. Y., Baek, Y. M., Choi, J. W., Bae, S. H., and Yun, J. W. (2007). Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in *ob/ob* mice. *Appl. Microbiol. Biot*., *75*, 1257-1265.

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.

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.

Dey, A., Bhunia, B., and Dutta, S. (2016). Studies on the effect of agitation and aeration for the improved protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. *Materials Today: Proceedings*, *3*(10), 3444-3449.

El Sayed, O. H., El-Sayed, A. E. K. M., Salem, H. M., Mahmoud, M. G., Asker, M. S., and Mohamed, S. S. (2015). Isolation, characterization and biological activities of exopolysaccharide produced by *Bacillus marinus*. *Der Pharma Chemica*, *7*(2), 200-208.

Gangadharan, D., Sivarrmakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. (2006). Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technology Biotechnology*, *44* (2), 269-274.

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, *46*, 531-542.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

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*, *2*, 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.

Kayalvizhi, N., and Gunasekaran, P. (2008). Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Letters in applied microbiology*, *47*, 600-607.

Kayalvizhi, N., and Gunasekaran, P. (2010). Purification and characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *15*, 365-370.

Kumar, R., Surendram, P.K., and Thampuram, N. (2009). Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Sallmonella* serovans isolated from seafood. *Food Control*, *20*, 376-380.

Lahtinen, S.J., Jalonen, L., Ouwehand, A.C., and Salminen, S.J. (2007). Specific *Bifidobacterium* strain isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, *117*, 125-128.

Lakshmanan, R., Jeya Shakila, R., and Jeyasekaran, G. (2002). Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (*Sardinella gibbosa*). *Food Research International*, *35*, 541-546.

Martins Simoes, P., Rasigade, J. P., Lemriss, H., Butin, M., Ginevra, C., Lemriss, S.,Goering, R. V., Ibrahimi, A., Picaud, J. C., El Kabbaj, S., and Laurent, F. (2013). Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*-SCC*cad/ars/cop*) in the neonatal sepsis-associated *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A. *Antimicrob Agents Chemother*, *57*, 6354–6357.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prevost, H., and Leroi, F. (2009). 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.

Na, J. S., Kim, T. H., Kim, H. S., Park, S. H., Song, H. S., Cha, S. W., and Yoon, H. J. (2009). Liver abscess and sepsis with *Bacillus pantothenticus* in an immunocompetent patient: A first case report. *World Journal of Gastroenterol*, *15*(42), 5360–5363.

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.

Oud, L. (2011). Community-acquired meningitis due to *Staphylococcus capitis* in the absence of neurologic trauma, surgery, or implants. *Heart Lung*, *40*, 467–471.

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.

Potumarthi, R. Subhakar, Ch., and Jetty, A. (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal*, *34*, 185-192.

Prakasham, R. S., Rao, Ch. S., and Sarma, P. N. (2006). Green gram husk an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, *97*, 1449-1454.

Rasigade, J. P., Raulin, O., Picaud, J. C., Tellini, C., Bes, M., Grando, J., Ben Said, M.,Claris, O., Etienne, J., Tigaud, S., and Laurent, F. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* with reduced vancomycin susceptibility causes late-onset sepsisin intensive care neonates. *Plos One*, *7*, e31548.

Rasulov, M. M., Kuznetsov, I. G., Slutskii, L. I., Velikaya, M. V., Zabozlaev, A. G., and Voronkov, M. G. (1993). Ulcerostatic effect of *Bacillus mucilaginosus* exopolysaccharide and its possible mechanisms. *B. Ekp. Biol. Med.*, *116*, 504-505.

Rautenbach, Marina., Vlok, N.M., Stander, M., and Hoppe, H.C. (2007). Inhibition of malaria parasite blood stages by tyrocidines, membrane-active cyclic peptide antibiotics from *Bacillus brevis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, *1768*, 1488–1497.

Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., de Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., and Clausen, I.G*., et al.* (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, *5*(10), r77.

Roh, J.Y., Kim, Y.S., Wang, Y., Liu, Q., Tao, X., Xu, H.G., Shim; H.J., Choi, J.Y., Lee, K.S., Jin, B.R., and Je. Y.H. (2010). Expression of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin in an antimicrobial *Bacillus brevis* strain. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *13*, 61–64.

Sansawat, A., and Thirabunyanom, M. (2009). Anti-*Aeromonas hydrophilia* activity and characterization of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *International Journal of Science and Technology*, *3*, 77-87.

Sen, R., and Babu, K. S. (2005). Modeling and optimization of the process conditions for biomass Production and sporulation of probiotic culture. *Process Biochemistry*, *40*(7), 2531-2538.

Shobharani, P., Padmaja, R. J., and Halami, P. M. (2015). Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512. *Research in Microbiology*, 166(6), 546-554.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

Stanbury, P. F., and Whitaker, A. (1984). *Principle of fermentation technology*. New York: Pergamon Press.

Su, F., and Xu, P. (2014). Genomic analysis of thermophilic *Bacillus coagulans* strains: efficient producers for platform bio-chemicals. *Scientific Reports*, *4*, 1-10.

Sumague, M. J. V., Mabesa, R. C., Dizon, E. I., Carpio, E. V., and Roxas, N. P. (2008). Predisposing Factors Contributing to Spoilage of Soy Sauce by *Bacillus circulans*. *Philippine Journal of Science*, *137*(2), 105-114.

Takano, T., Ohtsu, Y., Terasaki, T., Wada, Y., and Amano, J. (2011). Prosthetic valve endocarditis caused by *Staphylococcus capitis*: report of 4 cases. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, *6*, 131.

Teixeira, M.L., Cladera-Olivera, F., dos Santos, J., and Brandelli, A. (2009). Purification and characterization of a peptide from *Bacillus licheniformis* showing dual

antimicrobial and emulsifying activities. *Food Research International, 42*, 63-68.

ten Brink, B., Minekus, M., van der Vossen, J.M., Leer, R.J., and Huis in't Veld, J.H. (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J Appl Bacteriol*. *77*(2), 140-148.

Vasant, R.A., Thangaraj, M., Ajithkumar, T.T., Ramanadevi, V., and Bhimba, BV. (2013). Antagonistic Assay of Secondary Metabolites of Mangrove Associated Fungil Against Fish and Human Pathogens. *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences*, *1*, 1.

Velioglu, Y.S., Mazza, G. Gao, L., and Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4113-4117.

Wang, H., Jiang, X., Mu, H., Liang, X., and Guan, H. (2007). Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation. *Microbiol. Res*., *162*, 124-129.

Xue, C., Tian, L., Xu, M., Deng, Z., and Lin W. (2008). A New 24-membered Lactone and a New Polyene d -Lactone from the Marine Bacterium *Bacillus marinus. The Journal of Antibiotics*, *61*(11), 668–674

Yeh, M.S., Wei, Y.H., and Chang, J.S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, *41*, 1799-1805.

Yao, G., Gao, P., and Zhang, W. (2016). Complete Genome Sequence of Probiotic *Bacillus coagulans* HM-08: A Potential Lactic Acid Producer. *Journal of Biotechnology*, *228*, 71-72.

Yokomizo, Y., Watanabe, F., Imada, Y., Inumaru, S., Yanaka, T., and Tsuji, T. (2002). Mucosal immunoadjuvant activity of the low toxic recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin produced by *Bacillus brevis* for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *87*, 291–300.

Zhang, D.J., Liu R.F., Li, Y.G., Tao, L.M., and Tian, L. (2010). Two New Antifungal Cyclic Lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. *Chem. Pharm. Bull, 58*(12), 1630-1634.