



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย
โพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของ
ประเทศไทย

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

นางสุภัณฑิต นิมรัตน์
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256102A1080005
สัญญาเลขที่ 44/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย
โพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของ
ประเทศไทย

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

นางสุภัณฑิต นิ่มรัตน์¹
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย²

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

² ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 44/2561

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเรื่อง “การพัฒนาการควบคุมจุลินทรีย์ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทย” โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพริกชี้ฟ้าที่ผสมกับสารสกัดตะไคร้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* และสารผสมของสารทั้ง 2 กลุ่ม ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน จากการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์สูงในการยับยั้ง *B. cereus* มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้ง *S. Typhimurium* สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้เป็นอย่างดี มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อ *E. coli* และไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ ส่วนการเติมสารสกัดสมุนไพรผสมร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการเติมสารสกัดใดสารสกัดหนึ่งในการยับยั้ง *S. Typhimurium* และ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป และช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ยังมีฤทธิ์การยับยั้ง *S. Typhimurium*, *B. cereus* และ *S. aureus* สูงกว่าไนซิน ซึ่งเป็นสารกันเสียทางการค้าที่นิยมใช้ในปัจจุบัน นอกจากนี้การเติมสารสกัดต่างๆ 2 สัปดาห์ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* สามารถลดปริมาณ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* จาก $>1,100$ MPN/g เหลือ ≤ 3.0 MPN/g การเติมสารสกัดสมุนไพรผสมร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* มีผลทำให้ค่าความชื้นและค่า a_w เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิม รวมทั้งยังทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปทำให้หมักแปรรูปมีสีพอใช้ตามธรรมชาติในวันแรกของการทดลอง และแสดงความผิดปกติไปจากธรรมชาติเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน และหมักแปรรูปมีกลิ่นแตกต่างจากหมักแปรรูปดั้งเดิมเล็กน้อย คือ มีกลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 28 วัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารสกัดสมุนไพรผสม (พริกชี้ฟ้ากับตะไคร้) ร่วมกับการเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* สามารถลดการปนเปื้อนของ *S. Typhimurium*, *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป โดยมีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะทางประสาทสัมผัสเล็กน้อยในระดับที่ยอมรับได้

คำสำคัญ : แบคทีเรียโพรไบโอติก, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง, มาตรฐาน

Abstract

In this study entitled “development of bioactive compounds from probiotic bacteria for controlling microorganisms, and improving standard and quality of dried seafood products from Thailand”, inhibitory effects of combined ethanolic chili and galangal extracts, partial purified substances prepared from *Bacillus licheniformis* (PBL), and chili and galangal extracts mixed with PBL on four pathogens, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were investigated in dried processed squid products during a 28-day storage. Combined chili and galangal extracts (160 mg/mL) had strong activity against *B. cereus* and moderate activity against *E. coli* and *S. aureus*, but low inhibitory effect on *S. Typhimurium* in dried processed squid products. Partial purified substances from *B. licheniformis* were able to potently eliminate *B. cereus* and moderately eliminate *E. coli*, but unable to eliminate *S. aureus*. Inhibitory activity of mixed plant extract (chili and galangal) and PBL was as effective as plant extract or PBL alone against *S. Typhimurium* and *B. cereus* in dried processed squid products. Strong inhibitory effect on *E. coli* and *S. aureus* was observed when this mixture added in the squid product. In addition, the plant extracts mixed with PBL exhibited higher inhibitory activity against *S. Typhimurium*, *B. cereus* and *S. aureus*, compared to nisin, a commercial preservative. Addition of the bioactive agent every 2 weeks resulted in increased inhibitory effect on four tested pathogens. In particular, decreased numbers of *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* and *S. aureus* from $>1,100$ to ≤ 3.0 MPN/g were found in dried processed squid products when combined plant extracts mixed with PBL employed. Supplementation of mixed plant extracts and PBL caused significant ($P<0.05$) increase in moisture content and water activity and significant ($P<0.05$) decrease in pH in dried squid products. Dried squid products incorporated with plant extracts and PBL showed minor change in natural color at the beginning of experiment and moderate color change after a 28-day storage and also showed slight difference of natural smell (fair smell) during a 28-day storage. In conclusion, chili and galangal extracts mixed with PBL obviously reduced pathogen contamination (*S. Typhimurium*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus*) in dried squid products with minor and acceptable change in sensory characteristic.

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

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
Abstract.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	20
4 ผลการทดลอง.....	27
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	49
เอกสารอ้างอิง.....	56
ผลผลิต (Output).....	65
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก.....	12
2	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อปริมาณ <i>S. Typhimurium</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)	30
3	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>S. Typhimurium</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกใน ช่วงเวลากลางคืน)	31
4	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>E. coli</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)	32
5	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>E. coli</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลา กลางคืน)	33
6	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>B. cereus</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)	34
7	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>B. cereus</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกใน ช่วงเวลากลางคืน)	35
8	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>S. aureus</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)	36
9	ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>B. licheniformis</i> ต่อ <i>S. aureus</i> ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกใน ช่วงเวลากลางคืน)	37
10	ค่าความชื้น (%) ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>B. licheniformis</i>	39

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>B. licheniformis</i>	41
12	ค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>B. licheniformis</i>	43
13	ลักษณะสีของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>B. licheniformis</i>	44
14	ลักษณะกลิ่นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>B. licheniformis</i>	48

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	(a) <i>Bacillus licheniformis</i> ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (b) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>B. licheniformis</i>	27
2	(a) สารสกัดพริกชี้ฟ้า ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b) สารสกัดตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	28
3	(a) ไนซินที่ผลิตจาก <i>Lactococcus lactis</i> (b) สารละลายไนซินความเข้มข้น 1,000 IU.....	28
4	สี่ติดตามธรรมชาติของหมึกแปรรูปดั้งเดิมตลอดระยะเวลาการทดลอง (a) หมึกแปรรูปดั้งเดิมในวันแรกของการทดลอง (b) หมึกแปรรูปดั้งเดิมที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 28 ของการทดลอง (c) หมึกแปรรูปดั้งเดิมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 28 ของการทดลอง.....	45
5	สี่ของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ตลอดระยะเวลาการทดลอง (a) สี่พอใช้ตามธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ในวันแรกของการทดลอง (b) สี่ผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 28 ของการทดลอง (c) สี่ผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 28 ของการทดลอง.....	46
6	สี่ของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ตลอดระยะเวลาการทดลอง (a) สี่พอใช้ตามธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ในวันแรกของการทดลอง (b) สี่ผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 28 ของการทดลอง (c) สี่ผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 28 ของการทดลอง.....	47

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับคุณภาพของอาหารทะเลแห้งและอาหารทะเลแปรรูป พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ยกตัวอย่างเช่น สุบัญญัติ นิมรัตน์ 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* ส่วนการศึกษากการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีพ *Proteus*, *Enterobacter* และ *Klebsiella* (สุบัญญัติ นิมรัตน์ และคณะ, 2553ข) ศิริโฉม ทุงแก้ว และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์ (2550) ได้รายงานการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปลาหมึกแห้งปรุงรสพร้อมบริโภค พบการปนเปื้อนของ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* และ *Acinetobacter* ในขณะเดียวกันการศึกษาคูณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในต่างประเทศก็แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง เช่น ปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) และปลานวลจันทร์ตากแห้ง (*Cirrhinus microlepis*) ที่จำหน่ายในเมือง Penghu ประเทศไต้หวัน พบแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสารพิษประเภทฮิสตามีนหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus morgani*, *P. vulgaris*, *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 เพื่อให้อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยมีคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ของประเทศไทยและระดับสากล

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโอสซิน เป็นต้น (ten Brink et al., 1994) แบคทีเรียโอสซินสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 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* มีคุณสมบัติเป็นสารแบคทีเรียโอสซิน จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะศึกษาถึงการพัฒนาการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารทะเลแห้ง เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นสารปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ และแบคทีเรียโอสซิน เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกทำหน้าที่ยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรียก่อโรค โดยการไปปิดกั้นส่วนที่พิษจะเข้าสู่เซลล์และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้เพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเข้ายึดเกาะและเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ไว่ต่อสู้กับเชื้อโรคได้ (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

ในการศึกษาคั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยจำนวน 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

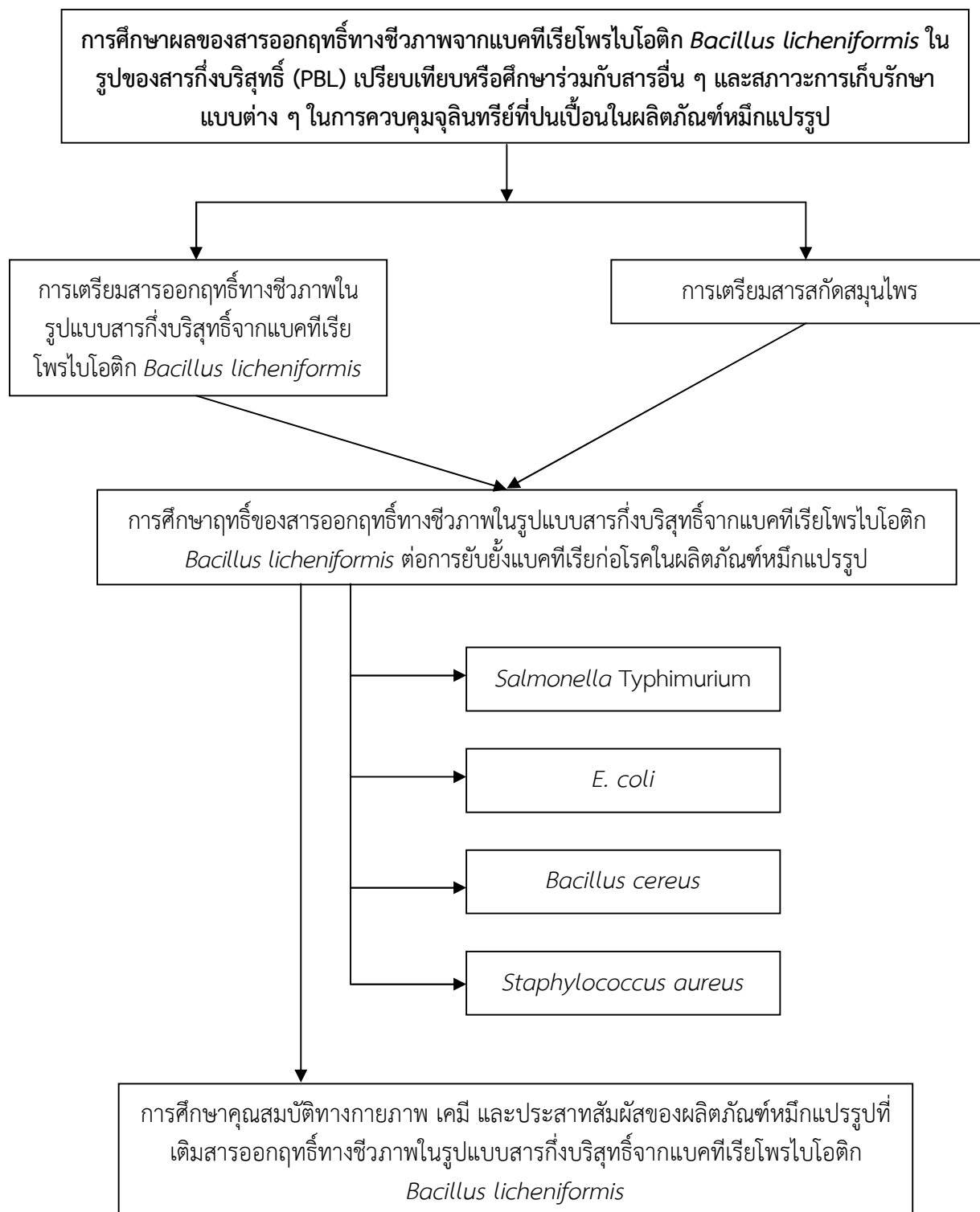
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้ง
2. เพื่อศึกษาหาระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมของการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งรวมทั้งสถานะการเก็บรักษาเพื่อทำให้อาหารทะเลมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ดีอย่างน้อยเทียบเท่ากับมาตรฐานทั้งในระดับประเทศและระดับนานาชาติ
3. เพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก สำหรับการนำมาทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในปีที่ 2 ทำการศึกษาถึงผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิด *Bacillus licheniformis* เปรียบเทียบหรือศึกษาร่วมกับสารอื่น ๆ ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งของประเทศไทยที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้ง
2. ทราบถึงระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมของการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งรวมทั้งสถานะการเก็บรักษาเพื่อทำให้อาหารทะเลมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ดี
3. สามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์เพื่อควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียรวมทั้งลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่างๆ ที่เกิดจากสารเคมีสังเคราะห์

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 มีกรรมวิธีการปรุงที่หลากหลาย และยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก ไม่ว่าจะเป็นด้านโปรตีน วิตามินและเกลือแร่ รวมถึงมีธาตุอาหารบางอย่างที่สำคัญและจำเป็นสำหรับมนุษย์ที่หาได้เฉพาะในอาหารทะเลเท่านั้น เช่น ธาตุไอโอดีน เป็นต้น (ศรีสมร คงพันธุ์ และมณี สุวรรณผ่อง, 2533)

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

ประโยชน์ของอาหารทะเล

อาหารทะเลมีประโยชน์เนื่องจากมีไขมันน้อยกว่าโปรตีนจากสัตว์อื่น ๆ ทั้งยังอุดมไปด้วยพอสฟอรัสและแคลเซียมที่จำเป็นสำหรับร่างกาย นอกจากนี้ยังมีโอกาสปนเปื้อนหรือมีการตกค้างของสารพิษน้อยกว่าเนื้อสัตว์ประเภทอื่น ๆ ประโยชน์ของอาหารทะเล เช่น

1. ประโยชน์จากหมึก ในหมึกจะมีกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 อยู่สูงมาก แม้ว่าหมึกจะมีโคเลสเตอรอลสูง แต่โอเมก้า 3 ที่มีอยู่ในหมึกนั้นจะไปช่วยต่อต้านไม่ให้ร่างกายมีโคเลสเตอรอลสูงขึ้นได้ และยังพบว่าโคเลสเตอรอลที่มีอยู่ในหมึกนั้นจะช่วยให้ผิวหนังแห้งตึง ใบหน้าไม่เหี่ยวอ่อนอีกด้วย

2. ประโยชน์จากปูและหอย ในเนื้อปูและหอยจะมีกรดอะมิโนอิสระกว่า 10 ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ กรดกลูตามิก ไกลซีน โพรลีน ฮีสทีดีนและอาร์จินีน เป็นต้น นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ บีหนึ่ง บีสอง บีสาม ซีและดี นอกจากนี้ในหอยนางรมยังมีสารประกอบสำคัญที่เรียกว่า

เทารีน (Taurine) และมีแร่ธาตุสังกะสีอยู่มาก ซึ่งสารสองตัวนี้จะทำงานร่วมกัน และมีผลต่อการส่งเสริมสมรรถภาพทางเพศได้ดี

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

2. แบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารทะเล

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

2.1 *Listeria monocytogenes*

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

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาปลายเซลล์หรือขั้วของเซลล์ มีขนาด 0.5-1.0×1.5-5.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ผิวน้ำเซลล์ประกอบด้วยลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่มีโครงสร้างคล้ายแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน ส่วนสายของพอลิแซ็กคาไรด์ไซด์ (Polysaccharide side chain) ที่ยื่นออกจากเยื่อหุ้มชั้นนอก (Lipopolysaccharide, LPS) เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (Susceptible) ต่อแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) หรือไพโอซิน (Pyocin) *P. aeruginosa* ยังมีชั้นเมือก (Slime layer) ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ และมีฟิลาที่ผิวเซลล์ด้วย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544) *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำในคนปกติทั่วไป โรคที่พบในคนทั่วไปจึงพบน้อย 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*

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนขนาดใหญ่ เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์ได้ สปอร์จะอยู่บริเวณกลางเซลล์หรือเกือบถึงปลายเซลล์และไม่ทำให้เซลล์บวม เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือแบบแอโรบ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้ดีคือ 10-49 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้ดีคือ 4.9-9.3 สปอร์ถูกทำลายได้เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3-4 นาที ตามปกติแบคทีเรียชนิดนี้พบได้ตามธรรมชาติ เช่น ดิน ฝุ่นละออง และปนเปื้อนในอาหาร เช่น ข้าวและแป้ง นอกจากนี้ยังพบในผักและเนื้อสัตว์ *B. cereus* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคจากการบริโภคอาหารชนิดหนึ่ง (ศิริโฉม พุงเกล้า, 2546) โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากสายพันธุ์ที่สร้าง Enterotoxin ซึ่งมี 2 ชนิดด้วยกัน ชนิดที่ 1 Emetic toxin ที่ออกซินชนิดนี้จะทนความร้อน และทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษหลังจากรับประทานอาหารที่มีพิษของเชื้อเข้าไป 1-6 ชั่วโมง โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนเป็นหลัก และมีอุจจาระร่วงเล็กน้อย ชนิดที่ 2 Diarrheal toxin เป็นที่ออกซินที่ไม่ทนความร้อน อาการจะเกิดภายใน 10-12 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มีพิษของเชื้อเข้าไป อาการจะเริ่มด้วยการปวดท้องรุนแรง อาเจียนและอุจจาระร่วงมาก (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2531)

2.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เซลล์เกาะกลุ่มกันคล้ายรวงงุ่น หรืออาจอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ จัดเป็นพวกเจริญแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน เมื่อเจริญบนอาหารแข็งธรรมดา มักให้โคโลนีสีเหลือง แต่บางสายพันธุ์โคโลนีอาจไม่มีสี ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) และเอนไซม์นิวคลีเอสชนิดทนความร้อน (Thermostable nuclease) ได้ รอดชีวิตอยู่ได้ในอาหารที่มีเกลือและน้ำตาลความเข้มข้นสูง ๆ ช่วงอุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญ คือ 35-40 องศาเซลเซียส ทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ดี (ศิริโฉม พุงเกล้า, 2546) *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้าง

สารพิษ คือ Enterotoxin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดีและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วย สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาที ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิน้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* มีชื่อเรียกว่า Staphyloenteroxicosis และ Staphyloentero-toxemia (บัญญัติ สุขศรีงาม และคณะ, 2551) อาหารเป็นพิษที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มี Enterotoxin ของ *S. aureus* มีระยะฟักตัวสั้นกว่าอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียอื่น ๆ คือ 2 หรือ 4 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง บางครั้งอาจพบมูกเลือดในอุจจาระ อาการที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ไม่รุนแรง (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

2.5 *Corynebacterium*

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

2.6 *Proteus*

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

แบคทีเรียสกุลนี้มีความสำคัญในการทำให้อาหารประเภทโปรตีนเกิดการเน่าเสีย 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 (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

2.7 *Yersinia enterocolytica*

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

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

2.8 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคืบ แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระ เด็กที่ป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงในปี ค.ศ. 1885 แบคทีเรียชนิดนี้มักจะทำให้เด็กทารกในประเทศที่กำลังพัฒนาเกิดอาการอุจจาระร่วง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียในลำไส้จึงพบบ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร การจัดจำแนกชนิดของ *E. coli* ได้มีการจำแนกออกตามความรุนแรงของอาการเกิดโรค ลักษณะในการเจริญและลักษณะทางพันธุกรรมได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

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

2.8.2 กลุ่มที่สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)) ได้มีการยอมรับเอนเทอโรท็อกซิเจนิก อีโคไล ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในคนตั้งแต่ปี ค.ศ.1968 ในขณะที่ประเทศอินเดียและบังคลาเทศให้ความสำคัญกับแบคทีเรียชนิดนี้ โดยถือว่าเป็นศัตรูร้ายแรง และต่อมา ETEC ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงกับนักท่องเที่ยว จึงมีชื่อว่า “Traveler’s diarrhea” หรือ “Turista” ซึ่งมักพบในนักท่องเที่ยวที่เดินทางจากประเทศที่เจริญ มีสุขอนามัยดี มายังประเทศกำลังพัฒนา

EPEC เป็นสาเหตุใหญ่ของการเกิดโรคท้องเดินในผู้ใหญ่และเด็ก Enterotoxin ไม่ทนความร้อน อาการของโรคที่เกิดจาก EPEC 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 นำนมดิบ และน้ำ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้สุก และน้ำนมที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2548)

2.8.3 กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (Enteropathogenic *E. coli* (EPEC))

เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในเด็กทารก (Infantile diarrhea) โดยผู้ป่วยมีอาการไข้ อาเจียนและอุจจาระมีมูกปนแต่ไม่มีเลือด มีรายงานการเกิดโรคนี้จากทั่วโลก กลไกการเกิดโรคอุจจาระร่วงไม่ได้เกิดจากการสร้างสารพิษหรือการบุกรุกเข้าเซลล์ แต่เกิดจากการที่ EPEC มีพลาสมิดขนาด 50-70 ล้านดาลตัน (Mda) ที่ควบคุมการสร้างแอดฮีซินชื่อ ETEC Adherence factor (EAF) ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อสามารถเกาะติด Hep-2 cells ในหลอดทดลองได้ด้วยลักษณะที่แตกต่างจากเชื้ออื่น เรียกว่า localized adherence และการมีเอนไซม์ *eae* บนโครโมโซมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชื่อ อินทิมีน (Intimin) ขนาด 94 กิโลดาลตัน ทำให้เซลล์สามารถเกาะติดกับผนังของลำไส้ เกิดการเรียงตัวของไซโทสเคลลิทัน (Cytoskeleton) และสายแอกทิน (Filamentous actin) ภายใต้อบริเวณที่แบคทีเรียเกาะอยู่เป็นรูปคล้ายฐานหรือแท่นรูปปั้น (Cup-like pedestals) เกิดการทำลายไมโครวิลไล (Microvilli) จนเกิดรอยราบเรียกว่า Attaching and effacing lesion เรียกกลไกนี้ว่า Attaching and effacement ผู้ป่วยจะเกิดอุจจาระร่วงในที่สุด เนื่องจากเซลล์สูญเสียการดูดสารกลับ (อสิยา จันทรวิทยานุชิต 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 เลือดและมูกปน

EIEC ส่วนใหญ่ประมาณ 2 ใน 3 จะมีลักษณะทางชีวเคมีแตกต่างจาก *E. coli* ทั่วไปคือ ไม่มีเอนไซม์ไลซินดีคาร์บอกซิเลส และไม่หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส เชื้อส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ ยกเว้นซีโรไทป์ O124, O144 และ O167 บางสายพันธุ์ เชื้อบุกรุกเข้าทำลายเซลล์เยื่อบุตาของหนูตะเภาทำให้ตาอักเสบได้ จึงใช้เป็นการทดสอบสำหรับแยกเชื้อนี้จาก *E. coli* สายพันธุ์อื่น เรียกการทดสอบนี้ว่า Sereny test (อสิยา จันทรวิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2553)

2.8.5 กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC))

สายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารพิษของ *Shigella* (Shiga-like toxins) และเป็นสารพิษประเภทเวโรทอกซิน (Verotoxin) คือ สารพิษที่สามารถฆ่าเซลล์เวโร (Vero cells) ในห้องทดลองได้ สารพิษของ EHEC มี 2 แบบ คือ SLT-I และ SLT-II (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2545)

3. โพรไบโอติก

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

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

โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีย่อยในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นทารก มีหลายชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก (อุทัย แก้วเอี่ยม, 2549)

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

บทบาทของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น กลุ่ม Lactobacilli จะสร้างน้ำย่อยเบต้า-กาแลคโตซิเดส ช่วยลดปริมาณน้ำตาลแลคโตสในอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงได้ นอกจากนี้สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ช่วยกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร น้ำย่อยบางชนิดจากโพรไบโอติกจะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่พิษจะเข้าสู่เซลล์ และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียเข้าเกาะได้ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด 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 พบว่าส่วนโสมที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าส่วนโสมที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB และ TSB โดยพบว่าสามารถยับยั้ง

แบคทีเรียแกรมบวก 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. สารต้านจุลชีพในส่วนใหญ่ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 เดือน มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลา โดยมีการยับยั้งได้นาน 4-7 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ สารต้านจุลชีพทนต่อความร้อนระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส โดยมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกัน เมื่อได้รับความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่นำมา ศึกษา การจำแนกชนิดของ *Bacillus* sp. K-05 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *B. subtilis* M04 เท่ากับ 99% จึงจัดว่า *Bacillus* sp. K-05 เป็น *B. subtilis* การสกัดแยกสารปฏิชีวนะด้วยตัวทำละลาย อินทรีย์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิล อีเทอร์ 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 ผลการทดสอบสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยมี ระบบตัวพา คือ เฮกเซน-เอทิลอะซิเตท ได้สารที่บริสุทธิ์ 2 สาร มีลักษณะเป็นผงสีขาว ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* จาก การวิเคราะห์โครงสร้างโดยวิธีทางเคมีสรุปได้ว่า สารกลุ่ม 1 คือ Cyclo(Leu-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 210.1446 กิโลดาลตัน สารกลุ่มสองคือ Cyclo(Val-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 196.1269 กิโลดาลตัน ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีสาร Cyclic dipeptide ดังกล่าวเป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิต จาก *B. subtilis*

นิตยา ลิ่มเจริญ 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 มีผลทำให้ ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น 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 และเมื่อให้อาหารผสม โพรไบโอติกอีกครั้งพบว่ากุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจำนวนเชื้อ *Vibrio* sp. ในลำไส้มี ปริมาณลดลง จากการศึกษานี้พบว่าการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้เป็นที่น่าพอใจ โดยควรให้ แบคทีเรียดังกล่าวอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเลี้ยง

ธนวัต เพ็งอ้น และคณะ (2551) ทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อคัดแยกและคัดเลือก แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาแพะ (*Pangasius bocourti*) พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้รวม 37 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติของ แบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S. aureus* และ

Aeromonas hydrophila ความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0 ความสามารถในการทนเกลือ น้ำดี (0.3 เปอร์เซ็นต์) ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง และความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 37 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ทนต่อสภาพความเป็นกรดสูง มีความสามารถในการทนเกลือ น้ำดี 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

สุบัติน นิมรัตน์ 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 และเปรียบเทียบกับการใช้ยาออกซีเตตระไซคลิน 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 สำหรับออกซีเตตระไซคลิน คลอแรมฟินิคอล 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 มาทำการทดสอบสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง *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* และสังเกตได้ว่าการยับยั้งของ *Bifidobacterium* เกิดจากการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเกิดจากการผลิตสารประกอบที่เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อน จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะของ *Bifidobacterium* ไม่ใช่กรดอินทรีย์แต่เป็นลักษณะที่ไม่พบทั่วไปของ *Bifidobacterium* อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนสูงอายุมิมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *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* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากที่สุดในตัวอย่างไม่อาหารทะเล (18 ตัวอย่าง) ซึ่งการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในอาหารทะเลอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าแบคทีเรียชนิดนี้มีการปนเปื้อนต่อไปยังอาหารทะเลแบบพร้อมบริโภค

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

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 แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ไม่ผลิตฮิสตามีนและไทรามิน และพบว่าไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนั้นยังได้ศึกษาถึงอัตราการเจริญที่อุณหภูมิต่างกันของ *L. piscium* 1 ไอโซเลท และ *L. gelidum* 1 ไอโซเลท เพื่อยืนยันคุณสมบัติความชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ 1 ใน 7 เชื้อที่แยกได้สามารถผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ส่วนกลไกในการยับยั้งของเชื้ออื่นที่แยกได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดเนื่องจากการแข่งขันในการจับกับสารตั้งต้น การไม่ปรากฏคุณสมบัติในการผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซินทำให้แบคทีเรียเหล่านี้เป็นผลดีในการพิจารณาสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศฝรั่งเศส

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 การทนกรดและการทนต่อเกลือ น้ำดี, Autoaggregation, Coaggregation, ความไม่ชอบน้ำและการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ เมื่อเจริญในสภาวะความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 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*-Hexadecane (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) รายงานการตรวจสอบฮิสตามีนและแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างฮิสตามีน และคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง 46 ตัวอย่าง ที่ขายปลีกในตลาดในเมือง Penghu ประเทศไต้หวัน จากการศึกษาพบว่าอาหารทะเลแห้งมีค่าความเป็นกรด-ต่าง 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

จากรายงานการศึกษายังไม่มีรายงานที่ทำการศึกษากับการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ เพื่อทำการควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารทะเลแห้ง รวมทั้งการเพิ่มคุณสมบัติทางด้านสุขภาพอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น คุณสมบัติด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะทำให้อาหารทะเลแห้งมีคุณภาพที่โดดเด่นทุกด้านทั้งทางด้านมาตรฐานจุลินทรีย์ รวมทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการในปัจจุบัน คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลและรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยครั้งนี้ ดังต่อไปนี้

5. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

5.1 อนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant)

อนุมูลอิสระ คือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การสร้างพันธะโควาเลนต์กับ

โปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติ (เจนจिरา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม, 2554; Ames et al., 1993) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคมะเร็ง โรคต่อกระจก และโรคข้ออักเสบจากโรครูมาตอยด์ เป็นต้น (ประสงค์ เทียนบุญ, 2553) อนุมูลอิสระเกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การติดเชื้อโรคการได้รับรังสียูวี ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงลงได้ด้วยสารที่เรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (เจนจिरา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม, 2554)

5.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (เจนจिरา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม, 2554; Halliwell, 2009) สารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั้งในธรรมชาติและในร่างกายมนุษย์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) (เจนจिरา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม, 2554; Velioglu et al., 1998) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบในร่างกายมนุษย์ เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) กลูตาไทโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (albumin) บิลิรูบิน (bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) กลูตาไทโอน (glutathione) ทรานสเฟอริน (transferrin) ยูบิควินอล (ubiquinol) และยูเรต (urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะแต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “oxidative stress” ขึ้นภายใต้สภาวะดังกล่าว อนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติได้ (เจนจिरา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม, 2554)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

หมึกแปรรูป

2. วัสดุอุปกรณ์

- 2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
- 2.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2.3 กระดาษกรอง No. 5 (Whatman, Buckinghamshire, England)
- 2.4 ถังไดอะไลซิส (Spectra/Por, California, U.S.A)
- 2.5 ออโตปิเปต P100 (Gilson, pipetman P100, Paris, France)
- 2.6 ออโตปิเปต P1000 (Gilson, pipetman P1000, Paris, France)
- 2.7 ตู้บลมร้อน (Mettler, UFB 500, Schwabach, Germany)
- 2.8 ตู้บ่มเชื้อ (Mettler, BE 400, เมือง Schwabach, Germany)
- 2.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Daihan, Wacs-1450, Seoul, Korea)
- 2.10 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CH30RF200, Japan)
- 2.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Super Clean, Super Clean150 VC, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
- 2.12 หลอดทดลอง (Test Tube)
- 2.13 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova, 43/43R, U.S.A)
- 2.14 Syringe filter 0.45 μm (Whatman, Buckinghamshire, England)

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 Ammonium sulfate (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2 Sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.3 Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.4 Ethanol 70% และ 95%
- 3.5 Sodium chloride (NaCl) (Loba Chemie, Mumbai, India)
- 3.6 Sodium pyruvate (Alfa Aesar, Heysham, England)
- 3.7 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.8 Disodium phosphate (Na_2HPO_4) (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.9 ไอโอดีน (Central Drug House, New Delhi, India)
- 3.10 Trypticase Soy Agar (TSA) (Difco, Maryland, U.S.A)

- 3.11 Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.12 Buffered peptone water (BPW) (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.13 Tetrathionate (TT) broth (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.14 Hektoen enteric (HE) agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.15 Triple sugar iron (TSI) agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.16 Lysine iron agar (LIA) (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.17 Lauryl Tryptose (LST) Broth (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.18 EC broth (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.19 Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.20 Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.21 Nutrient Agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.22 Baird parker agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.23 Peptone (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.24 Egg Yolk Tellurite Emulsion (Himedia, Mumbai, India)
- 3.25 Lysine Indole Motility (LIM) medium (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.26 Simmons citrate agar (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.27 MR – VP medium (Difco, Maryland, U.S.A)
- 3.28 Nitrate broth
- 3.29 ไนซีน (Sigma Aldrich, Missouri, U.S.A.)
- 3.30 Polymyxin B (Himedia, Mumbai, India)
- 3.31 Plasma

วิธีดำเนินการทดลอง

การศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) เปรียบเทียบหรือศึกษาร่วมกับสารอื่น ๆ และสภาวะการเก็บรักษาแบบต่าง ๆ ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

1. การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* (Partial *B. licheniformis* bioactive compound: PBL) (Ahern et al., 2003)

นำแบคทีเรีย *B. 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 จากนั้นค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 484.54 กรัมต่อลิตร (ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 80%) โดยทำการคนต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่ตกตะกอนและละลายในสารละลาย Sodium phosphate buffer (0.05 M; pH 7) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (ใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1,000 ดาลตัน) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M; pH 7.0) ในอัตราส่วนสารละลายในถุงไดอะไลซิส 1 ส่วน ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 1, 2 และ 4 ชั่วโมง แล้วนำสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (ดัดแปลงมาจาก Quave et al., 2008)

จากการศึกษาที่ผ่านมาของโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาศักยภาพพืชสมุนไพรไทยเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งสู่มาตรฐานสากลทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556-2558 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำสารสกัดสมุนไพรจากโครงการวิจัยเรื่องดังกล่าวมาศึกษาเปรียบเทียบหรือศึกษาร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำพริกชี้ฟ้าและตะไคร้มาล้างทำความสะอาด และหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น และนำสมุนไพรแต่ละชนิดใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ขวดละ 50 กรัม แล้วเติม 95% เอทานอล ในอัตราส่วนสมุนไพรต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 10 จากนั้นนำไปใส่เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบเท่ากับ 100-120 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง กรองสารสกัดสมุนไพรด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump) จากนั้นนำ

สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ผ่านการกรองแล้วมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 175 มิลลิบาร์ เพื่อสกัดเอทานอลออกจากสารสกัดสมุนไพร จากนั้นนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3. การศึกษาถึงผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) และสภาวะการเก็บรักษาแบบต่าง ๆ ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

ทำการศึกษาต่อเนื่องถึงการควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) ภายใต้ 2 สภาวะ คือ 1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน เพื่อศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และยี่ดระยะเวลาของผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตัดผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปให้มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2 x 2 เซนติเมตร แบ่งออกเป็น 10 ชุดการทดลอง โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกและสารสกัดสมุนไพร

ชุดการทดลองที่ 1 เติมน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เติเมทานอล 35% (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 3 เติมนิซินความเข้มข้น 1,000 IU/ มิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 เติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าและตะไคร้

ชุดการทดลองที่ 5 เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก

B. licheniformis ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL)

ชุดการทดลองที่ 6 เติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ร่วมกับเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL)

ชุดการทดลองที่ 7 เติมนิซินความเข้มข้น 1,000 IU/ มิลลิลิตร และเติมนิซินทุก ๆ 2 สัปดาห์

ชุดการทดลองที่ 8 เติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ และเติมทุก ๆ 2 สัปดาห์

ชุดการทดลองที่ 9 เติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) และเติม PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์

ชุดการทดลองที่ 10 เติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ร่วมกับเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) และเติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าและตะไคร้และ PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์

เติมแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ (ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus*) ความเข้มข้น 10^4 CFU/mL ลงบนตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป โดยคำนวณให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 CFU ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม จากนั้นเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) และสารสกัดสมุนไพรพริกขี้หนูและตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามชุดการทดลอง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการหยดลงบนตัวอย่างด้วยออตโตปีเปต จากนั้นนำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow biological safety cabinet เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปมาเก็บรักษาในถุงพลาสติก แล้วนำมาเก็บรักษาภายใต้สภาวะ 2 สภาวะ คือ 1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน จากนั้นนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งมาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาเป็นระยะเวลา 28 วัน

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

4.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *S. Typhimurium* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (ดัดแปลงมาจาก FDA, 1998; Borowsky et al., 2007; Bansal et al., 2010)

เตรียมตัวอย่างหมักแปรรูปตามชุดการทดลองข้อ 3 ที่เติม *S. Typhimurium* จากนั้นนำตัวอย่างหมักแปรรูปมาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยนำตัวอย่างหมักแปรรูปมาเจือจางด้วย Buffered peptone water (BPW) ให้ได้ระดับการเจือจาง $10^{-1} - 10^{-3}$ ระดับความเจือจางละ 3 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง จากนั้นคัดเลือกหลอดที่มีความขุ่น มาถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Tetrathionate broth (TT) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง คัดเลือกหลอดที่มีความขุ่นมาขีดเชื้อ (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen enteric (HE) agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม โคโลนีสีเขียวแกมน้ำเงิน อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง บางโคโลนีอาจมีสีดำขนาดใหญ่ตรงกลางหรือเกือบทั้งโคโลนี จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบยืนยันผล โดยขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar และ Lysine iron agar (LIA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง แล้วนำไปอ่านค่าจากตาราง MPN รายงานผลการทดลองในหน่วยของ MPN/g

4.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (BAM, 2002)

ทำการทดสอบด้วยวิธี MPN โดยเตรียมตัวอย่างหมักแปรรูปตามชุดการทดลองข้อ 3 แต่เติม *E. coli* แทน *S. Typhimurium* จากนั้นนำตัวอย่างหมักแปรรูปมาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา

โดยนำตัวอย่างหมักแปรรูปมาเจือจางด้วย Butterfield phosphate buffered dilution water ให้ได้ระดับความเจือจาง $10^{-1} - 10^{-3}$ คูดตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose (LST) Broth หลอดละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง และ 48 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊ส และบันทึกผลการทดลอง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดแก๊สลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง และ 48 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่เกิดแก๊ส บันทึกผลการทดลอง จากนั้นนำเชื้อจากหลอดที่เกิดแก๊สในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth มาขีด (Streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *E. coli* คือ ลักษณะโคโลนีสีม่วงหรือดำ อาจเกิดหรือไม่เกิด Metallic sheen มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ IMViC test เพื่อยืนยันผลการทดลอง

4.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (BAM, 2012)

ทำการทดสอบด้วยวิธี MPN โดยเตรียมตัวอย่างหมักแปรรูปตามชุดการทดลองข้อ 3 แต่เติม *B. cereus* แทน *S. Typhimurium* จากนั้นนำตัวอย่างหมักแปรรูปมาศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยนำตัวอย่างหมักแปรรูปมาเจือจางด้วย Butterfield phosphate buffered dilution water ให้ได้ระดับความเจือจาง $10^{-1} - 10^{-3}$ จากนั้นคูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ที่เติม 0.15% Polymyxin B ระดับความเจือจางละ 3 หลอด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง คัดเลือกหลอดที่มีความขุ่นมาขีดเชื้อ (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *B. cereus* คือ มีสีชมพู มีกิจกรรมเอนไซม์ Lecithinase โดยลักษณะมีโซนทึบ (Opaque Zone) รอบ ๆ โคโลนี มาขีดเชื้อ (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar เพื่อนำมาย้อมแกรม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อยืนยันผลการทดลอง

4.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (FDA, 1998)

ทำการทดสอบด้วยวิธี MPN โดยเตรียมตัวอย่างหมักแปรรูปตามชุดการทดลองข้อ 3 แต่เติม *S. aureus* แทน *S. Typhimurium* โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งและเจือจางด้วย Butterfield phosphate buffered dilution water ให้ได้ระดับความเจือจาง $10^{-1} - 10^{-3}$ ปิเปตตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม 10% NaCl และ 1% Sodium pyruvate ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่ขุ่นมา Streak ลงบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird parker agar ที่เติม Egg yolk และ potassium tellurite จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *S. aureus* คือ โคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มีสีเทาถึงดำ อาจมีขอบใสหรือไม่มีก็ได้ มีโซนที่บรอบ ๆ โคโลนี และอาจมีการสร้างหรือไม่สร้างโซนใสรอบนอกโคโลนี และนำมาทดสอบผล Coagulase test เพื่อยืนยันผลการทดลอง นำผลการทดลองมาอ่านค่าเทียบจากตาราง MPN โดยการรายงานผลการทดลองจะรายงานในหน่วยของ MPN/g

5. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและประสาทสัมผัส ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis*

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกมาศึกษาลักษณะทางกายภาพ เคมีและประสาทสัมผัส ได้แก่ การวัดค่าความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (Water activity; a_w) สี และกลิ่น ดังต่อไปนี้

5.1 การวัดค่าความชื้น

นำตัวอย่างหมักแปรรูปมาปั่นให้ละเอียด จากนั้นนำมาใส่ในภาชนะอลูมิเนียม แล้วนำไปวัดค่าความชื้นด้วยเครื่องวัดความชื้น Sartorius MA150

5.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (ดัดแปลงมาจาก Shah et al., 2009)

นำตัวอย่างหมักแปรรูปปริมาณ 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ Metrohm 913 pH Meter

5.3 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (Water activity; a_w)

ตามวิธีของ AOAC (2000)

นำตัวอย่างหมักแปรรูปมาปั่นให้ละเอียด แล้วนำไปวัดค่า a_w โดยใช้เครื่องวัดค่า a_w Novasina MS1 Set-aw

5.4 การศึกษาคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* (Partial *B. licheniformis* bioactive compound: PBL)

นำตัวอย่างหมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกมาประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สีและกลิ่น โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาฉะเชิงเทรา

บทที่ 4

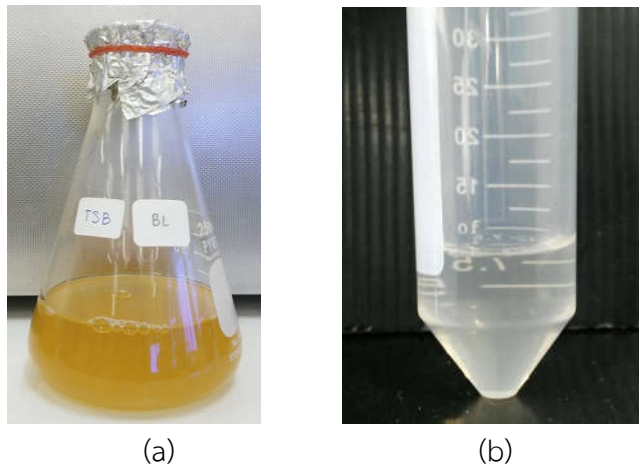
ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ (PBL) เปรียบเทียบหรือศึกษาร่วมกับสารอื่น ๆ และสภาวะการเก็บรักษาแบบต่าง ๆ ในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1. ลักษณะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* สารสกัดสมุนไพรฟ้าและตะไคร้ และไนซิน

1.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis*

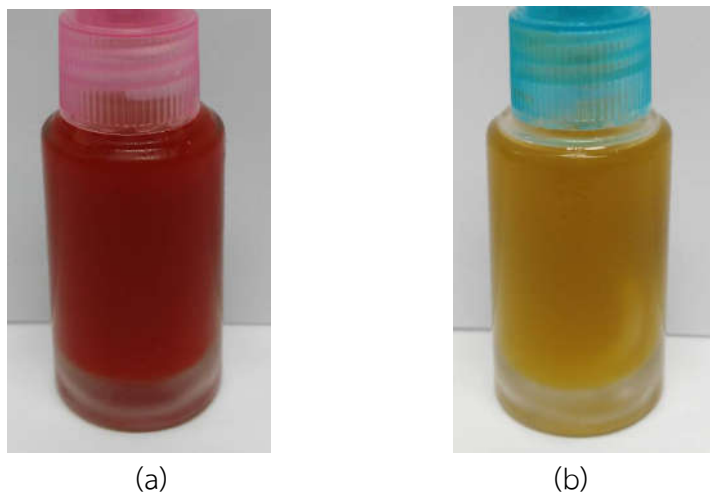
จากการเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* พบว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้มีลักษณะใส ไม่มีสี ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 (a) *Bacillus licheniformis* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth
(b) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

1.2 สารสกัดสมุนไพรฟ้าและตะไคร้

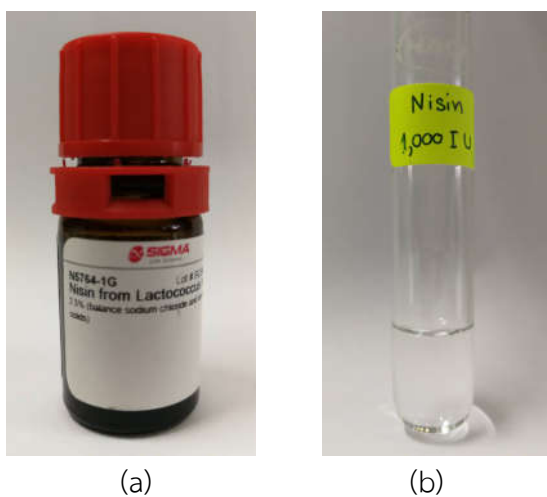
สารสกัดสมุนไพรฟ้าและตะไคร้หลังจากการสกัดและนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีลักษณะแสดงดังภาพที่ 2 โดยสารสกัดพริกขี้ฟ้ามีสีแดง และสารสกัดตะไคร้มีสีเหลืองเข้ม



ภาพที่ 2 (a) สารสกัดฟริกซีฟ้า ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(b) สารสกัดตะไคร้ ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 ไนซิน

ไนซินที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis*



ภาพที่ 3 (a) ไนซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* (b) สารละลายไนซินความเข้มข้น 1,000 IU

2.ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

2.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *S. Typhimurium* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์และสารสกัดสมุนไพรในการควบคุม *S. Typhimurium* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป พบว่าผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณ *S. Typhimurium* ไม่ลดลงเมื่อเติมไนซิน โดยมีปริมาณมากกว่า 1,100 MPN/g ตลอดระยะเวลา 28 วันของการเก็บรักษา ในขณะที่การเติมสารสกัดสมุนไพร การเติม PBL และการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL มีประสิทธิภาพในการลด *S. Typhimurium* ไม่ดีนัก โดยลดแบคทีเรียชนิดนี้จาก 1,100 MPN/g เหลือ 240, 460 และ 240 MPN/g ตามลำดับ ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา ดังนั้นจึงต้องพัฒนาวิธีการกำจัดแบคทีเรียชนิดนี้ด้วยการเติมสารสกัดต่างๆ 2 สัปดาห์ ซึ่งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดีกว่าการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว กล่าวคือ สารสกัดสมุนไพรและสารสกัด PBL สามารถลดปริมาณ *S. Typhimurium* ลงเหลือ 23 และ 93 MPN/g ตามลำดับ ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาที่น่าสนใจคือ การเติมสารสกัดร่วมระหว่างสารสกัดสมุนไพรและ PBL สามารถลดปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้ให้เหลือน้อยกว่า 3 MPN/g ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อปริมาณ *S. Typhimurium* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>Salmonella Typhimurium</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
เอทานอล 35%		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
ไนซิน 1,000 IU/mL		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
สารสกัดสมุนไพร		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	240
PBL		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	460
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	240
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	460
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	>1,100	>1,100	23	23
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	>1,100	>1,100	240	93
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	>1,100	>1,100	23	<3.0

ส่วนการเก็บรักษาหมักแปรรูปที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน พบว่าปริมาณ *S. Typhimurium* ในทุกชุดการทดลอง รวมทั้งหมักแปรรูปที่เติมน้ำกลั่นมีปริมาณลดลงเหลือน้อยกว่า 3 MPN/g ภายในวันที่ 14 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *S. Typhimurium* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>Salmonella Typhimurium</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	>1,100	1,100	<3.0	<3.0	<3.0
เอทานอล 35%		>1,100	460	<3.0	<3.0	<3.0
ไนซิน 1,000 IU/mL		>1,100	240	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพร		>1,100	240	<3.0	<3.0	<3.0
PBL		>1,100	210	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		>1,100	150	<3.0	<3.0	<3.0
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	240	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	240	<3.0	<3.0	<3.0
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	240	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	150	<3.0	<3.0	<3.0

2.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

จากการตรวจปริมาณ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าในกลุ่มที่เติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว สารสกัดสมุนไพรมีประสิทธิภาพไม่มากนักในการลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรคนิดนี้ กล่าวคือปริมาณ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพร และเติมเอทานอล 35% มีค่าใกล้เคียงกัน (38 และ 43 MPN/g ในวันที่ 28 ของการทดลอง) ส่วนการเติมสารสกัด PBL ก็มีประสิทธิภาพไม่สูงมากนักในการกำจัด *E. coli* โดยปริมาณของ *E. coli* ลดลงเหลือใกล้เคียงกับการเติมสองสารที่กล่าวมาข้างต้น คือ ลดลงเหลือ 43 MPN/g ในวันที่ 28 ของการทดลอง ในขณะที่การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL มีการเสริมฤทธิ์ในการลดปริมาณ *E. coli* ให้เหลือ 23 MPN/g ซึ่งใกล้เคียงกับการเติมไนซินที่มีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวเท่ากับ 21 MPN/g ในวันที่ 28 ของการทดลอง ส่วนการเติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์นั้น พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียดังกล่าวเพิ่มขึ้น โดยพบการรอดชีวิตของ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพร และเติมสารสกัด PBL เท่ากับ 3.6 และ 23 MPN/g ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการทดลอง ส่วนการเติมสารสกัดร่วมกันระหว่างสารสกัดสมุนไพรและ PBL พบปริมาณ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ในวันสุดท้ายของการทดลอง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>E. coli</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	1,100	460	240	240	75
เอทานอล 35%		460	240	210	150	43
ไนซิน 1,000 IU/mL		460	240	210	150	21
สารสกัดสมุนไพร		460	240	93	43	38
PBL		460	460	150	93	43
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		93	93	93	43	23
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		1,100	240	150	93	15
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		460	240	43	14	3.6
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		460	460	93	43	23
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		93	43	9.2	3.6	<3.0

จากการตรวจหาปริมาณ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน พบว่าชุดที่เติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL และชุดที่เติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL ทุก ๆ 2 สัปดาห์ สามารถลดปริมาณ *E. coli* จาก >1,100 MPN/g ให้เหลือ 15 MPN/g ในระยะเวลาหลังหยุดสารลงบนชิ้นหมัก 1 วัน และปริมาณ *E. coli* ลดลงเหลือ <3.0 MPN/g ในทั้งสองชุดการทดลองภายในวันที่ 7 ของการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องและลดเหลือปริมาณน้อยกว่า 3 MPN/g ภายในวันที่ 7 ของการทดลอง ยกเว้นหมักแปรรูปที่เติมเอทานอล 35% ที่ปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้ลดลงต่ำกว่า 3 MPN/g หลังการเติมเพียง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>E. coli</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	93	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
เอทานอล 35%		<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
ไนซิน 1,000 IU/mL		460	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพร		93	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
PBL		240	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		15	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		240	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		43	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		460	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		15	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0

2.3 ผลของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์และสารสกัดสมุนไพรในการควบคุม *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป พบว่าการเติมสารสกัดลงในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปเพียงครั้งเดียวและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* โดยการเติมไนซินสามารถลดปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้ให้เหลือ 23 MPN/g ในวันสุดท้ายของการทดลอง ส่วนการเติมสาร PBL นั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าไนซิน โดย *B. cereus* ลดลงเหลือ 14 MPN/g และการเติมสารสกัดสมุนไพรเพียงอย่างเดียวหรือการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL สามารถลดปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดีที่สุด จาก >1,100 MPN/g เหลือ 9.2 MPN/g ในวันที่ 28 ของการทดลอง (ตารางที่ 5) เมื่อเติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์พบว่าสามารถลดการรอดชีวิตของ *B. cereus* ได้ดีกว่าการเติมเพียงครั้งเดียว โดยการเติมสารสกัดสมุนไพร การเติมสาร PBL และการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL สามารถลดปริมาณ *B. cereus* ลงเหลือ 3.6, 3.6 และ 3.0 MPN/g ในวันที่ 28 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>B. cereus</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	460	240	150	93	43
เอทานอล 35%		150	93	75	43	38
ไนซิน 1,000 IU/mL		43	75	43	23	23
สารสกัดสมุนไพร		38	36	28	16	9.2
PBL		43	28	43	21	14
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		36	29	23	15	9.2
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		43	43	15	9.2	7.4
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		43	28	9.2	6.2	3.6
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		23	21	20	7.4	3.6
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		29	15	7.4	3.6	3.0

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>B. cereus</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	240	150	93	43	23
เอทานอล 35%		93	75	43	38	23
โนซิน 1,000 IU/mL		43	43	29	23	14
สารสกัดสมุนไพร		75	43	38	23	16
PBL		43	38	43	23	15
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		93	43	23	21	11
โนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		43	23	15	9.2	3.0
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		93	21	14	9.2	3.6
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		43	23	15	15	9.2
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		43	38	9.2	7.4	<3.0

จากตารางที่ 7 การตรวจปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนพบว่าสารสกัดในทุกชุดการทดลองสามารถลดปริมาณ *B. cereus* จาก >1,100 MPN/g ให้เหลือ 43-93 MPN/g ในระยะเวลาหลังหยุดสารลงบนชิ้นหมักเป็นเวลา 1 วัน ยกเว้นชุดการทดลองที่เติมน้ำกลั่นที่ยังคงตรวจพบ *B. cereus* ในปริมาณ 240 MPN/g เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่ได้รับสารสกัดเพียงครั้งเดียวตรวจพบ *B. cereus* ในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมโนซิน สารสกัดสมุนไพร สาร PBL และสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL มีปริมาณ *B. cereus* เท่ากับ 14, 16, 15 และ 11 MPN/g ตามลำดับ ส่วนการเติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์นั้นสามารถกำจัด *B. cereus* ได้ดีการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว โดยปริมาณ *B. cereus* ลดลงเหลือ 3.0, 3.6, 9.2 และ <3.0 MPN/g ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการทดลอง

2.4 ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้ง *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป

จากการศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์และสารสกัดสมุนไพรในการควบคุม *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป พบว่าการเติมโนซินหรือเติมสาร PBL ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* เนื่องจากยังคงพบแบคทีเรียชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปในปริมาณที่สูงมาก (1,100 MPN/g หรือมากกว่า) ตลอดระยะเวลาการทดลอง 28 วัน ในขณะที่การเติมสารสกัดสมุนไพรหรือการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL สามารถลดปริมาณ *S. aureus* ได้อย่างมาก โดยลดลงเหลือ 43 และ 15 MPN/g ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการทดลอง เช่นเดียวกับผลการศึกษาในแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดที่รายงานก่อนหน้านี้ การเติมสารสกัดต่างๆ 2 สัปดาห์ สามารถกำจัด *S. aureus* ได้ดีกว่าการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมการเติมสารสกัดสมุนไพร และการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL สามารถลดปริมาณ *S. aureus* ให้เหลือน้อยกว่า 3 MPN/g ภายในวันที่ 21 และ 28 ของการทดลองตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>S. aureus</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
เอทานอล 35%		>1,100	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
โนซิน 1,000 IU/mL		>1,100	>1,100	1,100	>1,100	>1,100
สารสกัดสมุนไพร		>1,100	460	460	460	43
PBL		>1,100	>1,100	1,100	1,100	1,100
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		>1,100	>1,100	210	75	15
โนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	1,100	1,100	460	150
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	460	93	<3.0	<3.0
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		>1,100	>1,100	1,100	460	43
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		1,100	>1,100	93	3.6	<3.0

จากการตรวจปริมาณ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่วิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน พบว่าผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมไนซิน สารสกัดสมุนไพร สาร PBL และสารสกัดร่วมระหว่างสมุนไพรกับ PBL เพียงครั้งเดียวมีปริมาณ *S. aureus* ลดลงเหลือ <3.0 ถึง 43 MPN/g ภายในวันที่ 7 ของการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ *S. aureus* ในทุกชุดการทดลองลดลงเหลือ <3.0 MPN/g ภายในวันที่ 14 ของการทดลอง ส่วนการเติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *S. aureus* ได้ดีกว่าการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมสารสกัดสมุนไพรหรือการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL ที่สามารถลดปริมาณ *S. aureus* จาก >1,100 เหลือ 21 และ 93 MPN/g ตามลำดับ ภายใน 24 ชั่วโมงของการทดลอง และลดลงเหลือน้อยกว่า 3.0 MPN/g ภายในวันที่ 7 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ต่อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป (เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน)

ชุดการทดลอง	ปริมาณ <i>S. aureus</i> (MPN/g)					
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
น้ำกลั่น	>1,100	1,100	150	<3.0	<3.0	<3.0
เอทานอล 35%		1,100	150	<3.0	<3.0	<3.0
ไนซิน 1,000 IU/mL		460	43	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพร		29	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
PBL		240	23	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL		93	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
ไนซิน 1,000 IU/mL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		460	23	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพร (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		21	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		240	23	<3.0	<3.0	<3.0
สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL (เติมทุก ๆ 2 สัปดาห์)		93	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0

3. คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

จากการศึกษาในข้อที่ 2 ถึงฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป แสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL มีประสิทธิภาพที่ดีในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป ดังนั้นการศึกษาในหัวข้อคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis* จึงคัดเลือกเฉพาะการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิคดังกล่าวมาศึกษา โดยได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

จากการวัดค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* และเติมสารสกัดสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมที่ไม่ได้เติมสารอันใดทั้งสิ้น พบว่าความชื้นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ $11.43 \pm 0.30\%$ ในวันแรกของการทดลอง เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมเป็นระยะเวลา 28 วัน ทั้งแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมค่อนข้างคงที่และต่ำ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง $10.46 \pm 0.19\%$ ถึง $14.00 \pm 0.90\%$ และ $9.36 \pm 0.22\%$ ถึง $10.73 \pm 0.23\%$ ตามลำดับ การเติมสารสกัดไม่ว่าจะเป็นน้ำกลั่น สารสกัดสมุนไพร สาร PBL รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคมิผลทำให้ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมสารมากกว่า 1 ครั้ง (ตารางที่ 10) นอกจากนี้ความชื้นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดังกล่าวที่เก็บภายใต้สภาวะแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน ยกเว้นผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติม *S. Typhimurium* และสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL ที่มีความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จาก $27.20 \pm 1.78\%$ ในวันแรกของการทดลอง เป็น $44.22 \pm 1.41\%$ ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าความชื้น (%) ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา				
	Day 0	การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวัน และปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน		เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		Day 7	Day 28	Day 7	Day 28
หมักแปรรูปดั้งเดิม	11.43±0.30 ^{c,1}	14.00±0.90 ^{d,45}	10.46±0.19 ^{b,2}	10.73±0.23 ^{bc,1}	9.36±0.22 ^{a,1}
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้	18.76±1.04 ^{bc,2}	11.08±0.95 ^{a,23}	19.64±0.10 ^{c,3}	17.27±0.57 ^{b,23}	27.14±2.07 ^{d,3}
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ร่วมกับ PBL	29.81±0.97 ^{c,4}	14.79±0.57 ^{a,56}	24.87±2.05 ^{b,5}	25.87±0.02 ^{b,4}	39.51±0.30 ^{d,4}
<i>E. coli</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>E. coli</i> และเติมน้ำกลั่น	25.21±2.15 ^{c,3}	15.29±1.02 ^{b,56}	10.33±0.98 ^{a,2}	17.17±0.59 ^{b,23}	14.77±2.62 ^{b,2}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>E. coli</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	37.92±0.67 ^{b,5}	17.73±0.90 ^{a,7}	38.04±0.60 ^{b,7}	18.14±2.87 ^{a,3}	41.90±0.41 ^{c,45}
<i>S. Typhimurium</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และเติมน้ำกลั่น	27.25±1.05 ^{b,34}	7.72±1.07 ^{a,1}	9.17±0.35 ^{a,12}	27.00±3.96 ^{b,4}	24.52±4.36 ^{b,3}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	27.20±1.78 ^{b,34}	12.70±0.40 ^{a,34}	28.05±0.78 ^{b,6}	31.56±1.60 ^{c,5}	44.22±1.41 ^{d,5}
<i>B. cereus</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>B. cereus</i> และเติมน้ำกลั่น	27.33±4.05 ^{b,34}	10.53±0.42 ^{a,2}	9.57±0.72 ^{a,12}	25.43±0.86 ^{b,4}	25.92±0.88 ^{b,3}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>B. cereus</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	37.23±0.21 ^{d,5}	12.46±0.34 ^{a,34}	27.79±1.02 ^{b,6}	32.10±0.89 ^{c,5}	43.23±0.47 ^{e,5}
<i>S. aureus</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. aureus</i> และเติมน้ำกลั่น	29.53±2.24 ^{c,4}	15.91±2.22 ^{b,6}	8.41±1.09 ^{a,1}	14.86±1.93 ^{b,23}	17.30±2.15 ^{b,2}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. aureus</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	29.23±1.72 ^{e,4}	17.97±0.81 ^{b,7}	22.43±0.38 ^{c,4}	14.07±2.11 ^{a,2}	25.41±0.48 ^{d,3}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.2 ค่าความเป็นกรด-ต่างของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

จากการวัดค่าความเป็นกรด-ต่างของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* และเติมสารสกัดสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมที่ไม่ได้เติมสารอันตรายทั้งสิ้น พบว่าค่าความเป็นกรด-ต่างของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมมีความเป็นกรดอ่อน ซึ่งค่าความเป็นกรด-ต่างในวันแรกของการทดลองเท่ากับ 6.27 ± 0.05 ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 28 วัน ทั้งแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ต่างของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.06 ± 0.05 ถึง 6.16 ± 0.28 และ 6.26 ± 0.02 ถึง 6.28 ± 0.09 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL ลงในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปทั้งสภาวะที่มีและไม่มีคาร์บอนของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ต่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากสภาวะปกติของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิม โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 5.97 ± 0.07 ถึง 6.15 ± 0.04 เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดังกล่าวภายใต้สภาวะแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ต่างมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จนมีค่าอยู่ในช่วง 5.61 ± 0.04 ถึง 5.80 ± 0.08 และ 5.74 ± 0.04 ถึง 5.95 ± 0.05 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา				
	Day 0	การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวัน และปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน		เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		Day 7	Day 28	Day 7	Day 28
หมักแปรรูปดั้งเดิม	6.27±0.05 ^{b,5}	6.06±0.05 ^{a,23}	6.16±0.28 ^{ab,4}	6.26±0.02 ^{b,12}	6.28±0.09 ^{b,5}
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้	5.97±0.07 ^{b,1}	6.04±0.14 ^{b,123}	5.71±0.06 ^{a,2}	6.03±0.11 ^{b,1}	5.75±0.06 ^{a,1}
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ร่วมกับ PBL	6.13±0.07 ^{d,4}	6.04±0.13 ^{c,123}	5.80±0.08 ^{a,2}	6.18±0.04 ^{d,1}	5.95±0.05 ^{b,3}
<i>E. coli</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>E. coli</i> และเติมน้ำกลั่น	6.01±0.09 ^{a,12}	6.03±0.09 ^{a,123}	6.18±0.07 ^{b,4}	6.14±0.05 ^{b,1}	6.28±0.08 ^{c,5}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>E. coli</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	6.15±0.04 ^{c,4}	6.00±0.13 ^{b,12}	5.76±0.03 ^{a,2}	6.10±0.07 ^{c,1}	5.94±0.06 ^{b,23}
<i>S. Typhimurium</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และเติมน้ำกลั่น	6.12±0.08 ^{a,4}	6.33±0.06 ^{bc,5}	6.19±0.08 ^{a,4}	6.38±0.09 ^{c,12}	6.29±0.05 ^{b,5}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	6.09±0.04 ^{ab,34}	6.12±0.06 ^{ab,34}	5.80±0.08 ^{a,2}	6.54±1.07 ^{b,2}	5.89±0.05 ^{a,23}
<i>B. cereus</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>B. cereus</i> และเติมน้ำกลั่น	6.32±0.03 ^{c,5}	6.22±0.11 ^{b,4}	6.05±0.04 ^{a,3}	6.21±0.10 ^{b,12}	6.21±0.12 ^{b,4}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>B. cereus</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	6.04±0.03 ^{d,23}	5.95±0.12 ^{c,1}	5.75±0.05 ^{a,2}	6.02±0.06 ^{cd,1}	5.88±0.07 ^{b,2}
<i>S. aureus</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. aureus</i> และเติมน้ำกลั่น	6.29±0.04 ^{b,5}	6.12±0.08 ^{a,34}	6.05±0.05 ^{a,3}	6.30±0.09 ^{b,12}	6.29±0.09 ^{b,5}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. aureus</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	5.97±0.14 ^{c,1}	6.02±0.13 ^{c,123}	5.61±0.04 ^{a,1}	6.02±0.02 ^{c,1}	5.74±0.04 ^{b,1}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.3 ค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (Water activity; a_w) ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

จากการวัดปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (a_w) ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* และเติมสารสกัดสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรร่วมกับ PBL เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมที่ไม่ได้เติมสารอันใดทั้งสิ้น พบว่าค่า a_w ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 0.491 ± 0.001 ในวันแรกของการทดลอง เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมเป็นระยะเวลา 28 วัน ทั้งแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่า a_w ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิมค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.423 ± 0.005 ถึง 0.481 ± 0.001 และ 0.474 ± 0.003 ถึง 0.528 ± 0.003 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า a_w มีความแปรผันตรงกับจำนวนครั้งที่มีการเติมสารลงในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป กล่าวคือการเติมสารหลายชนิด เช่น สารสกัดสมุนไพร การเติมแบคทีเรียก่อโรคและการเติมสาร PBL ลงในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปทำให้มีค่า a_w สูงกว่าการเติมสารสกัดสมุนไพรเพียงครั้งเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดังกล่าวทั้งภายใต้สภาวะแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน มีแนวโน้มทำให้ค่า a_w สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติม *S. aureus* สารสกัดสมุนไพรและ PBL และเก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน ที่ค่า a_w ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จาก 0.714 ± 0.002 เป็น 0.633 ± 0.017 ในวันสุดท้ายของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา				
	Day 0	การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวัน และปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน		เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		Day 7	Day 28	Day 7	Day 28
หมักแปรรูปดั้งเดิม	0.491±0.001 ^{d,1}	0.481±0.001 ^{c,1}	0.423±0.005 ^{a,1}	0.474±0.003 ^{b,1}	0.528±0.003 ^{e,2}
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้	0.496±0.002 ^{b,1}	0.477±0.005 ^{a,1}	0.885±0.006 ^{d,6}	0.488±0.008 ^{ab,2}	0.827±0.017 ^{c,5}
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ร่วมกับ PBL	0.602±0.001 ^{b,2}	0.485±0.003 ^{a,1}	0.823±0.008 ^{d,5}	0.767±0.003 ^{c,78}	0.949±0.012 ^{e,8}
<i>E. coli</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>E. coli</i> และเติมน้ำกลั่น	0.687±0.006 ^{b,4}	0.688±0.002 ^{b,3}	0.448±0.015 ^{a,2}	0.767±0.003 ^{d,78}	0.717±0.010 ^{c,3}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>E. coli</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	0.749±0.018 ^{a,7}	0.741±0.018 ^{a,5}	0.816±0.005 ^{b,5}	0.753±0.002 ^{a,6}	0.849±0.006 ^{c,6}
<i>S. Typhimurium</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และเติมน้ำกลั่น	0.736±0.008 ^{e,6}	0.484±0.003 ^{c,1}	0.451±0.009 ^{b,2}	0.602±0.002 ^{d,3}	0.434±0.011 ^{a,1}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	0.725±0.002 ^{b,56}	0.502±0.007 ^{a,2}	0.928±0.004 ^{e,8}	0.752±0.009 ^{c,6}	0.875±0.020 ^{d,7}
<i>B. cereus</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>B. cereus</i> และเติมน้ำกลั่น	0.655±0.007 ^{e,3}	0.488±0.007 ^{c,1}	0.412±0.009 ^{a,1}	0.617±0.005 ^{d,4}	0.434±0.021 ^{b,1}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>B. cereus</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	0.684±0.004 ^{b,4}	0.505±0.012 ^{a,2}	0.911±0.010 ^{e,7}	0.759±0.007 ^{c,67}	0.893±0.008 ^{d,7}
<i>S. aureus</i>					
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. aureus</i> และเติมน้ำกลั่น	0.721±0.003 ^{c,5}	0.706±0.003 ^{b,4}	0.487±0.004 ^{a,3}	0.773±0.002 ^{d,8}	0.764±0.012 ^{d,4}
ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่มีเชื้อ <i>S. aureus</i> และเติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL	0.714±0.002 ^{b,5}	0.748±0.001 ^{c,5}	0.633±0.017 ^{a,4}	0.726±0.002 ^{b,5}	0.851±0.009 ^{d,6}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.4 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

เมื่อทดสอบลักษณะสีของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis* โดยส่งวิเคราะห์ที่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด พบว่าหมึกแปรรูปดั้งเดิมมีสีดีตามธรรมชาติตั้งแต่วันแรกของการทดลองจนถึงวันที่ 28 ของการทดลอง ทั้งสภาวะที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4) ส่วนหมึกในชุดควบคุมคือหมึกแปรรูปที่เติมน้ำกลั่นนั้นถือว่าสีดีตามธรรมชาติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 28 วัน ภายใต้ทั้งสองสภาวะของการเก็บรักษาตัวอย่าง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL นั้นพบว่าหมึกมีสีพอใช้ตามธรรมชาติในวันแรกของการทดลอง และผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปแสดงผิดปกติไปจากธรรมชาติเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน ภายใต้ทั้งสองสภาวะ คือ การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 5 และ 6

ตารางที่ 13 ลักษณะสีของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา		
	Day 0	การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน	เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
		Day 28	Day 28
หมึกแปรรูปดั้งเดิม	สีดีตามธรรมชาติ	สีดีตามธรรมชาติ	สีดีตามธรรมชาติ
หมึกที่เติมน้ำกลั่น	สีพอใช้ตามธรรมชาติ	สีดีตามธรรมชาติ	สีดีตามธรรมชาติ
หมึกที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้	สีพอใช้ตามธรรมชาติ	สีผิดปกติไปจากธรรมชาติ	สีผิดปกติไปจากธรรมชาติ
หมึกที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ร่วมกับ PBL	สีพอใช้ตามธรรมชาติ	สีผิดปกติไปจากธรรมชาติ	สีผิดปกติไปจากธรรมชาติ

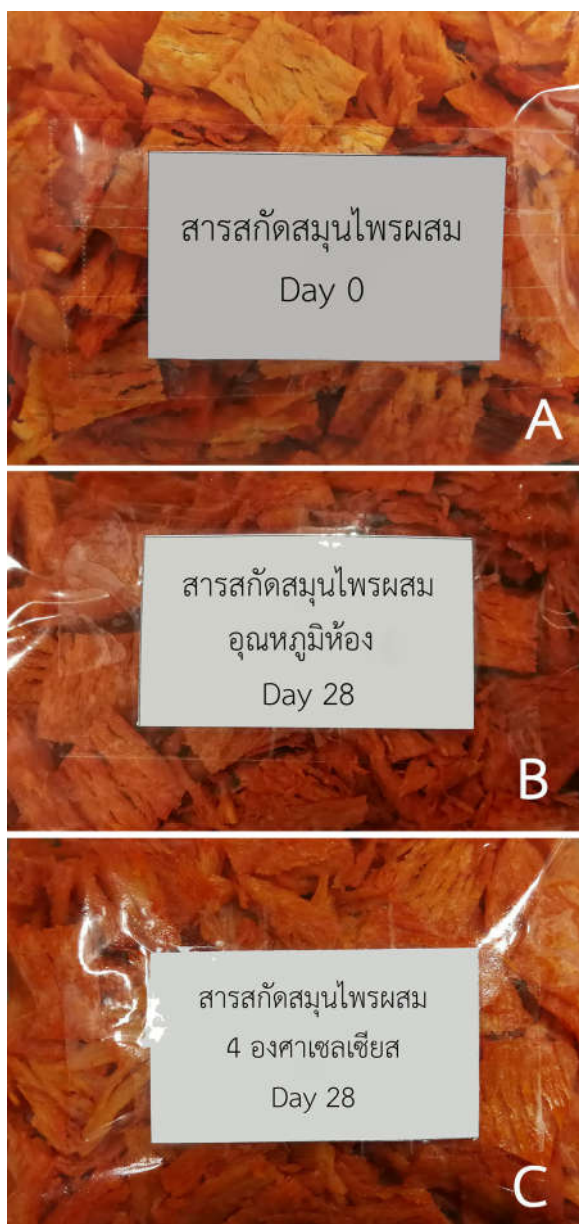


ภาพที่ 4 สีดีตามธรรมชาติของหมึกแปรรูปดั้งเดิมตลอดระยะเวลาการทดลอง

(A) หมึกแปรรูปดั้งเดิมในวันแรกของการทดลอง

(B) หมึกแปรรูปดั้งเดิมที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 28 ของการทดลอง

(C) หมึกแปรรูปดั้งเดิมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 28 ของการทดลอง



- ภาพที่ 5 สีของหมักแปรรูปที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ตลอดระยะเวลาการทดลอง
- (A) สีพอใช้ตามธรรมชาติของหมักแปรรูปที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ในวันแรกของการทดลอง
- (B) สีผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมักแปรรูปที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 28 ของการทดลอง
- (C) สีผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมักแปรรูปที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 28 ของการทดลอง



- ภาพที่ 6** สีของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ตลอดระยะเวลาการทดลอง
- (A) สีพอใช้ตามธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ในวันแรกของการทดลอง
 - (B) สีผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 28 ของการทดลอง
 - (C) สีผิดปกติไปจากธรรมชาติของหมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและ PBL ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 28 ของการทดลอง

นอกจากนี้เมื่อทดสอบลักษณะกลิ่นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis* โดยส่งวิเคราะห์ที่ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด พบว่าหมักแปรรูปดั้งเดิมมีกลิ่นดีตามธรรมชาติตั้งแต่วันแรกของการทดลองจนถึงวันที่ 28 ของการทดลอง ทั้งสภาวะที่เก็บแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมน้ำกลั่นมีกลิ่นดีตามธรรมชาติเช่นเดียวกัน เมื่อเก็บรักษาภายใต้ทั้งสองสภาวะเป็นระยะเวลา 28 วัน และเมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL ลงในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปพบว่าหมักมีกลิ่นแตกต่างจากหมักแปรรูปดั้งเดิมเล็กน้อย คือ มีกลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติตลอดระยะเวลา 28 วันของการเก็บรักษาแบบเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ลักษณะกลิ่นของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบสารกึ่งบริสุทธิ์จาก *B. licheniformis*

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา		
	Day 0	การเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืน	เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
		Day 28	Day 28
หมักแปรรูปดั้งเดิม	กลิ่นดีตามธรรมชาติ	กลิ่นดีตามธรรมชาติ	กลิ่นดีตามธรรมชาติ
หมักที่เติมน้ำกลั่น	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ	กลิ่นดีตามธรรมชาติ	กลิ่นดีตามธรรมชาติ
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ
หมักที่เติมสารสกัดผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ร่วมกับ PBL	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ	กลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติ

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์สูงในการยับยั้ง *B. cereus* โดยสามารถลดปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปจาก $>1,100$ MPN/g เหลือ 9.2 MPN/g ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา รวมทั้งยังมีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป โดยแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ลดลงเหลือ 38 และ 43 MPN/g ตามลำดับ ในวันที่ 28 ของการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสมุนไพรผสมนี้มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้ง *S. Typhimurium* เนื่องจากมีการตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้เท่ากับ 240 MPN/g ในวันสุดท้ายของการทดลอง

2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้เป็นอย่างดี โดยลดแบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปจาก $>1,100$ MPN/g เหลือ 14 MPN/g ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา และมีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อ *E. coli* โดยแบคทีเรียชนิดนี้ลดลงเหลือ 43 MPN/g ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา ส่วน *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ติดต่อบริเวณ PBL เป็นอย่างมาก เนื่องจากยังคงพบแบคทีเรียชนิดนี้ในปริมาณสูงมาก (1,100 MPN/g หรือมากกว่า) ตลอดระยะเวลาการทดลอง

3. การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการเติมสารสกัดใตสารสกัดหนึ่งในการยับยั้ง *S. Typhimurium* และ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป และน่าสนใจมากกว่านั้น คือ สารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิดในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป คือ *E. coli* และ *S. aureus* ให้มีปริมาณต่ำกว่าการเติมสารสกัดใตสารสกัดหนึ่งเพียงชนิดเดียว โดยมีปริมาณลดลงเหลือ 23 และ 15 MPN/g ตามลำดับ นอกจากนี้การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ยังมีฤทธิ์การยับยั้ง *S. Typhimurium*, *B. cereus* และ *S. aureus* สูงกว่าในซัน ซึ่งเป็นสารกันเสียทางการค้าที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

4. การเติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ที่สามารถลดปริมาณ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* จาก $>1,100$ MPN/g เหลือเท่ากับ ≤ 3.0 MPN/g

5. แบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางวันและปิดถุงพลาสติกในช่วงเวลากลางคืนทั้งสภาวะที่เติมสารสกัดเพียงครั้งเดียวและที่เติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์ มีปริมาณลดลงจากน้อยกว่า 3 MPN/g ภายในวันที่ 7-14 ของการทดลอง ยกเว้น *B. cereus* ที่ยังคงพบการเจริญตลอด 28 วันของการเก็บรักษา ซึ่งมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม

การลดลงดังกล่าวน่าจะเกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากแบคทีเรียก่อโรคมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง รวมทั้งหมักแปรรูปที่เติมน้ำกลั่น

6. การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) มีผลทำให้ค่าความชื้นและค่า a_w เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิม รวมทั้งยังทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากสภาวะปกติของผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิม นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL นั้นพบว่าหมักแปรรูปมีสีพอใช้ตามธรรมชาติในวันแรกของการทดลอง และผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปแสดงความผิดปกติไปจากธรรมชาติเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน และหมักแปรรูปมีกลิ่นแตกต่างจากหมักแปรรูปดั้งเดิมเล็กน้อย คือ มีกลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 28 วัน

อภิปรายผลการทดลอง

ปัญหาความปลอดภัยทางด้านอาหารเป็นปัญหาที่มีความสำคัญยิ่ง การเจ็บป่วยอันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคและสารพิษที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน การควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถช่วยลดปัญหาการเกิดโรคระบาดจากการบริโภคอาหารได้ (Sultanbawa, 2011) อีกทั้งในปัจจุบันผู้บริโภคมีความกังวลต่อผลข้างเคียงของการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร (Sultanbawa, 2011; Lucera et al., 2012) จึงทำให้มีความสนใจในการนำสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแทนสารเคมีหรือสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น (Tyagi and Malik, 2011; Lucera et al., 2012) สารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์มีศักยภาพเพียงพอที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ได้หลายประเภท (Beuchat, 1994; Cichewicz and Thorpe, 1996; Sivaroban et al., 2008; Abdollahzadeh et al., 2014; Bajpai et al., 2014)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่างพริกชี้ฟ้ากับตะไคร้ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีฤทธิ์สูงในการยับยั้ง *B. cereus* และมีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสมุนไพรผสมนี้มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้ง *S. Typhimurium* จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากตะไคร้และพริกมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้หลายชนิด เช่น สารสกัดจากตะไคร้มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* เป็นต้น (Naik et al., 2010; Ewansiha et al., 2012; Jafari et al., 2012) และสารสกัดจากพริกสามารถยับยั้ง *Enterococcus faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* และ *E. coli* (Nascimento et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเติมสารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป ตามปกติแล้วการใช้สารสกัดผสมของพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

เป็นทางเลือกที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพโดยรวมของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยมีรายงานการศึกษาจำนวนหนึ่งแสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สูงกว่าการใช้สารสกัดเดี่ยวจากพืชแต่ละชนิด ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Kamatou et al. (2006) ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผสมระหว่าง *Salvia chamelaeagnea* L. และ *Leonotis leonurus* L. ในอัตราส่วนต่าง ๆ แสดงกิจกรรมการเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ *B. cereus* และ *S. aureus* และ Al-Bayati (2008) ที่ทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจาก *Thymus vulgaris* และ *Pimpinella anisum* พบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhi*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* โดยการใช้ น้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิด แสดงค่า MIC ที่น้อยกว่าการใช้ น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด แยกกัน

การออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารประกอบทั้งกลุ่มหลักและกลุ่มรองจากสารสกัดของพืชแต่ละชนิดนั้นแสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สูงกว่าการใช้สารประกอบกลุ่มใดเพียงกลุ่มเดียว (Burt, 2004) สารออกฤทธิ์กลุ่มต่าง ๆ จากทั้งพริกขี้หนูและตะไคร้พบว่ามีส่วนประกอบแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน โดยพริกขี้หนูมีสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบหลัก (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550) ได้แก่ Flavonoid, Cinnamic acid, m-coumaric acid และ o-coumaric acid (Dorantes et al., 2000) ส่วนสารสกัดตะไคร้มีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่ม Monoterpene โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Citral ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุด (Ganjewala et al., 2012) การทำงานของสารกลุ่มต่าง ๆ ทั้งจากพริกขี้หนูและตะไคร้ที่มีการออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายต่าง ๆ ของแบคทีเรีย โดยสารกลุ่มฟีนอลิกจะจับที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีผลทำให้ผนังเซลล์เสียรูปร่าง เกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการแทรกซึมของสารสกัดผ่านเข้าไปยังตำแหน่งที่สำคัญภายในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้มีผลไปรบกวนความเสถียรของชั้น Phospholipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์ส่วนประกอบโครงสร้างเซลล์ (Kim et al, 1995; Sikkema et al., 1995) ส่วนสารประกอบ Citral และอนุพันธ์ของสารประกอบ Citral มีผลต่อทั้งไซโทพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เกิดการแสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Somolinos et al., 2009) การออกฤทธิ์ของสารประกอบแต่ละกลุ่มจากพืชทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนี้ อาจจะทำงานร่วมกันและไปมีผลต่อบริเวณเป้าหมายที่อยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ 1 ตำแหน่ง หรือหลายตำแหน่ง โดยการออกฤทธิ์ของสารจากสมุนไพรที่บริเวณต่าง ๆ ในเซลล์จุลินทรีย์นั้นสามารถแสดงกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงกว่าการใช้สารสกัดจากพืชเพียงชนิดเดียว ซึ่งประสิทธิภาพที่เพิ่มสูงขึ้นจากการทำงานร่วมกันของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด เรียกว่า Synergistic effect (Adwan and Mhanna, 2009; Adwan et al., 2010)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ในการศึกษาในครั้งนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้เป็นอย่างดี และมีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางในการยับยั้ง *E. coli* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่สังเกตเห็นในการศึกษาในครั้งนี้ อาจเกิดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า Bacteriocins และ

Bacteriocin-like peptide ดังรายงานก่อนหน้านี้นี้หลายฉบับที่ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น การศึกษาของ Cladera-Olivera et al. (2004) พบว่า Bacteriocin-like substance ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* strain P40 มีฤทธิ์การยับยั้งกว้าง โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรคสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหาร การแพทย์และดิน ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium fimi*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus intermedius*, *Rhodococcus* sp., *Streptococcus* sp. และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia carotorovora*, *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella Gallinarium* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kayalvizhi and Gunasekaran (2010) ที่พบว่า *B. licheniformis* MKU3 ผลิตสารกลุ่ม Bacteriocin-like peptide ที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกชนิดต่าง ๆ และ *E. coli* DH5x

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่ม Bacteriocins และ Bacteriocin-like substances ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ถูกรายงานออกมาอย่างต่อเนื่องถึงคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ยกตัวอย่างเช่น Bacitracin เป็นสารต้านจุลชีพกลุ่มเปปไทด์ชนิดแรกที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ซึ่งในปัจจุบันถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทางการแพทย์และสัตววิทยา (He et al., 2006) และ Lichenicidin เป็น Bacteriocin ในกลุ่มย่อยของ Lantibiotic อีกชนิดหนึ่ง ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ATCC 14580 และ *B. licheniformis* DSM 13 สารชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *B. subtilis* และ Enterococci สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin (Vancomycin-resistant enterococci; Begley et al., 2009; Dischinger et al., 2009) *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นมีความสามารถผลิต Lichenicidin ได้เช่นเดียวกัน ได้แก่ *B. licheniformis* VPS50.2 ซึ่ง Lichenicidin ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes*, Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) และ β -hemolytic streptococci (Beric et al., 2013) *B. licheniformis* นอกจากจะมีความสามารถในการผลิต Bacteriocins และ Bacteriocin-like substances ได้แล้ว แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น ได้แก่ สารกลุ่ม Polyketides ที่มีชื่อว่า Macrolactins และ Amicoumacins สารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ในการทำลาย *S. Typhi* (Arbsuwan et al., 2017) และ สารลดแรงตึงผิว (Biosurfactant) กลุ่ม Lipopeptide ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *S. aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Proteus vulgaris* (Gomaa, 2013)

การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ในการศึกษาในครั้งนี้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการเติมสารสกัดโอสสารสกัดหนึ่งในการยับยั้ง *S. Typhimurium* และ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป และน่าสนใจมากกว่านั้น คือ สารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้ง

แบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูป คือ *E. coli* และ *S. aureus* ให้มีปริมาณต่ำกว่า การเติมสารสกัดไตสารสกัดหนึ่งเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ยังมีฤทธิ์การยับยั้ง *S. Typhimurium*, *B. cereus* และ *S. aureus* สูงกว่าไนซิน ซึ่งเป็นสารกันเสียทางการค้าที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ในปัจจุบันยังไม่มี การศึกษาถึงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดสมุนไพรกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่ม Bacteriocins และ Bacteriocin-like substances ที่ผลิตจาก *Bacillus* แต่อย่างไรก็ตามยังคงมี รายงานจำนวนหนึ่งที่ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดสมุนไพรกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ กลุ่ม Bacteriocins และ Bacteriocin-like substances ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก คือ ไนซิน โดย พบว่าการเติมไนซิน Z ร่วมกับ Thymol สามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 7644 และ *B. subtilis* ATCC 33712 (Ettayebi et al., 2000) เมื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของสาร ผสมระหว่างไนซินกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นและไนซินกับสารสกัดจากชาเขียว ซึ่งเป็นสารสกัดที่อุดม ไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบหลัก (Epicatechin, Caffeic acid) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน พบว่าสารสกัดผสมทั้งสองชนิดสามารถทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบ ภายในเซลล์ของ *L. monocytogenes* ได้อย่างชัดเจนและรุนแรง ส่งผลให้แบคทีเรียชนิดนี้ลด ปริมาณจาก 10^6 CFU/mL ในช่วงเริ่มต้นการทดลองจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ (Undetectable level) และ 3.76 CFU/mL หลังการสัมผัสไนซินที่ผสมกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นและไนซินที่ผสมกับ สารสกัดชาเขียว ตามลำดับ (Sivaroban et al., 2008) สารผสมระหว่างไนซินกับน้ำมันหอมระเหย ที่สกัดได้มาจากพืชที่มีการศึกษาเช่นเดียวกัน โดยการเติมสารผสมระหว่างไนซิน (ไนซิน A และไนซิน V) กับ Carvacrol, Thymol และ trans-Cinnamaldehyde มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ของ *L. monocytogenes* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ใน ระดับแบบจำลองในอาหาร (Food model; Field et al., 2015) จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์กัน ระหว่างสารสกัดสมุนไพรกับไนซินแล้วยังมีการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวระหว่างสารสกัดสมุนไพรกับ Bacteriocins ชนิดอื่นที่ชื่อว่า Enterocin AS-48 กับสารสกัดกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ Eugenol, Geraniol, Terpeneol, Carvacrol, Hydrocinnamic acid, Caffeic acid, Citral และ p-Coumaric acid ในซอส Carbonara โดยพบว่า *S. aureus* มีปริมาณลดลงจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ เมื่อเติมสาร Enterocin AS-48 (80 ug/mL) ร่วมกับ 126 nM Carvacrol หรือ 20 mM Hydrocinnamic acid (Grande et al., 2007) และการเติมสารผสมระหว่าง Bacteriocin ที่ผลิต จาก *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 กับน้ำมันหอมระเหยจาก Oregano มีประสิทธิภาพใน การยับยั้ง *L. monocytogenes* ในเนื้อหมูได้นานกว่า 3 สัปดาห์ (Ghalfi et al., 2007) การอธิบาย เหตุผลที่ทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าแบคทีเรียสูงขึ้นของสารสกัดสมุนไพรที่ผสมกับสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ในการศึกษาในครั้งนี้ทำได้ยาก เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรผสม ระหว่างฟริกซ์ฟ้ายกับตะไคร้เป็นสารสกัดหยาด ซึ่งสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรมีทั้งสารที่เป็น องค์ประกอบหลักและสารที่เป็นองค์ประกอบรอง สารองค์ประกอบทั้งหลักและรองนี้อาจมีอิทธิพล ต่อฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อผสมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* ดังนั้นคณะผู้วิจัยขอเสนอ สมมติฐานของการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดสมุนไพรที่ผสมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ 1) ฤทธิ์การทำลายเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ของ

สารสกัดสมุนไพรส่งผลให้การผ่านของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) เข้าภายในเซลล์ง่ายและเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจนเป็นอันตรายต่อเซลล์และเซลล์ตายในที่สุด (Ettayebi et al., 2000) 2) สารสกัดสมุนไพรอาจมีผลลดค่าประจุลบของ phospholipids บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) จับกับเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปภายในเซลล์มากขึ้น (Ming and Daeschel, 1995; Crandall and Montville, 1998) และ 3) การผสมกันระหว่างสารทั้งสองกลุ่มอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารที่ไม่มีฤทธิ์การยับยั้ง (Non-active antibacterial agents) เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Active form; Bapela et al., 2006)

การเติมสารสกัดทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมสารสกัดเพียงครั้งเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ที่สามารถลดปริมาณ *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* จาก $>1,100$ MPN/g เหลือเท่ากับ ≤ 3.0 MPN/g การเติมทุก ๆ 2 สัปดาห์นั้นจะทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองกลุ่มเพิ่มมากขึ้นจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียสูงขึ้นตามไปด้วย ดังการศึกษาของ Grande et al. (2007) ที่รายงานว่าความสามารถในการกำจัด *S. aureus* ในซอสผัก (Vegetable sauces) ของสาร Enterocin AS-48 ร่วมกับ Carvacrol หรือ Hydrocinnamic acid เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองกลุ่มที่เติมลงในซอส

การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) มีผลทำให้ค่าความชื้นและค่า a_w เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมักแปรรูปดั้งเดิม ตามปกติแล้วปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหารทั้งหมดประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนของน้ำที่เกาะติดกับอาหาร หรือถูกใช้ไปในการสร้างพันธะต่าง ๆ เช่น พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน และอีกส่วนหนึ่งคือ ปริมาณน้ำอิสระที่ไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการเกิดพันธะใด ๆ และจะอยู่ในช่องว่างของอาหาร ปริมาณความชื้น (Moisture Content) เป็นปริมาณน้ำทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร คือ รวมทั้งสองส่วนดังกล่าว ในขณะที่ค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ หรือค่า Water activity (a_w) เป็นโมเลกุลของน้ำที่พร้อมจะเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นไอซึ่งเป็นส่วนของน้ำอิสระ ในการทำแห้งจะเป็นการระเหยน้ำอิสระออกไป ดังนั้นเมื่อค่าความชื้นเพิ่มขึ้นค่า a_w มักเพิ่มขึ้นด้วย (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2546) ปริมาณความชื้นในอาหารเป็นค่าที่สำคัญในการวิเคราะห์อาหาร เป็นค่าที่บ่งชี้ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งจะบ่งบอกถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น นมผง ถั่ว ผลไม้อบแห้ง ข้าว ซึ่งความชื้นจะมีผลต่อความคงตัวและคุณภาพของอาหาร ปริมาณความชื้นจึงเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของอาหาร โดยเฉพาะการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ (Microbial spoilage) อาหารที่มีความชื้นหรือปริมาณน้ำสูงจะเป็นอาหารที่เสื่อมเสียง่าย (Perishable food) เนื่องจากมีสถานะเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา รวมทั้งเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogen) การสร้างสารพิษ (Toxin) ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ซึ่งมีผลกระทบต่ออาหารระหว่างการเก็บรักษา ทำให้อายุ

การวางจำหน่าย (Shelf life) หรือทำให้ระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหารให้คงอยู่ในสภาพเดิมสั้นลงอีก จากการศึกษาของศิริโฉม พุงเกล้า และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์ (2550) ได้สรุปไว้ว่า ปริมาณความชื้นในหมึกอบแบบกรอบที่เหลืออยู่ต่ำกว่าหมึกแปรรูปชนิดอื่น น่าจะส่งผลให้จุลินทรีย์ที่เหลืออยู่หรือปนเปื้อนภายหลังไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นได้ การเติมสารสกัดและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ลงในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปในการศึกษาในครั้งนี้มีผลทำให้ค่าความชื้นและค่า a_w เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปดั้งเดิม ดังนั้นอาจจะมีผลต่ออายุการวางจำหน่าย (Shelf life) หรือทำให้ระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปให้คงอยู่ในสภาพเดิมสั้นลง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาอายุของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปต่อไป ถึงแม้ว่าการเติมสารผสมทั้งสองชนิดดังกล่าวจะช่วยลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การเติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) ยังทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากสภาวะปกติของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปดั้งเดิม การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างอาจเกี่ยวข้องกับความเป็นกรดอ่อนๆ ของสารสกัดพริกชี้ฟ้าและตะไคร้ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูป ซึ่งสารสกัดสมุนไพรที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม Phenolic และ Flavonoid จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกรดอ่อนๆ เช่น สารสกัดจากเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum* Linn) เป็นต้น (Ahmad et al., 2015) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปที่เติมสารสกัดสมุนไพรร่วมกับสาร PBL พบว่าหมึกแปรรูปมีสีพอใช้ตามธรรมชาติในวันแรกของการทดลอง และผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปแสดงความผิดปกติไปจากธรรมชาติเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน และหมึกแปรรูปมีกลิ่นแตกต่างจากหมึกแปรรูปดั้งเดิมเล็กน้อยคือ มีกลิ่นพอใช้ตามธรรมชาติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 28 วัน จากการสังเกตสีของสารผสมระหว่างสารสกัดสมุนไพรกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *B. licheniformis* (PBL) พบว่าสารสกัดผสมดังกล่าวมีสีแดงปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจนและมีกลิ่นอ่อนๆ ของพริกและตะไคร้ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีและกลิ่นของผลิตภัณฑ์หมึกแปรรูปตามธรรมชาติเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงขึ้นและมีกลิ่นแตกต่างจากหมึกแปรรูปดั้งเดิมเล็กน้อยระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน เป็นเพราะสีและกลิ่นตามธรรมชาติของสารสกัดผสมดังกล่าวมา

เอกสารอ้างอิง

- คณะกรรมการกลุ่มผลิตภัณฑ์เคมีและจุลชีววิทยาของอาหาร. (2539). *เคมีและจุลชีววิทยาของอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). นนทบุรี: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช.
- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*, 1(1), 59-70.
- ชมพู ยิ้มโต. (2550). *การถนอมอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- คนูวัต เพ็งอ้น, ภัทชนาวรรณ พรหมนิม และสุชัยญา อรุณรุ่งโรจน์. (2551). การแยกและคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อใช้ในปลา. ใน *รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2551* (หน้า 435-443). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบัส*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- นิตยา ลิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อารีชัย, ชุมพล ศรีทอง และนิตี ชูเชิด. (2549). การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44* (หน้า 214-228). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บัญญัติ บุญญา. (2546). *แนวปฏิบัติและการประยุกต์ใช้เรื่องความปลอดภัยของอาหาร*. กรุงเทพฯ: เอ. อาร์. บีซีเนส เพรส.
- บัญญัติ สุขศรีงาม, นิสา ไกรรักษ์, พรรณีภา ศิริเพิ่มพูล, ศิริพร เอื้ออังกูร, สุภัณฑิต นิมรัตน์, อภริตี ปิลันธนาภักย์, กาญจนา หริ่มเพ็ง, ปรียา นุพาสันต์, ศิริโฉม พุงแก, สุดสายชล หอมทอง, สุดารัตน์ สอนจิตร และวรรณภา จงโยธา. (2551). *สถานการณ์การปนเปื้อนและพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแห้งเพื่อมุ่งสู่การเป็นศูนย์ตรวจจุลินทรีย์และการรับรองมาตรฐานสินค้าอาหารทะเลแห้ง*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุษกร อุตระชาติ. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. สงขลา: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- ประสงค์ เทียนบุญ (2553). บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. *วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ* (วคอก), 4(2), 69-76.
- ภัทรชัย กิรติสิน (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.

- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). *จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- ศรีสมร คงพันธุ์ และมณี สุวรรณผ่อง. (2533). *อาหารทะเล*. กรุงเทพฯ: แสงแดด.
- ศิริโฉม พุงแก และกิตติรัตน์ วงษ์อินทร์. (2550). คุณภาพทางจุลชีววิทยาของหมึกแห่งปทุมธานี บริเวณที่จำหน่ายปลีกในตลาดหนองมน ชลบุรี. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45* (หน้า 750-755). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริโฉม พุงแก. (2546). *จุลชีววิทยาทางอาหาร 1 (เฉพาะปฏิบัติการ)*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. (2546). Water activity กับการควบคุมอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร. *วารสารจารย์พา*, 9, 39-46.
- 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 นิมรรัตน์, เทวินทร์ แสนเสนา, น้ำผึ้ง บุตรโคตร, พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2557) ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารทะเลแห้ง. ใน *การประชุมวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 10* มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรีयर ทองเนียม. (2553ก). การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทโทโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*, 2(1), 70-84.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรีयर ทองเนียม. (2553ข). แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มแอนาโรแบคทีเรียซีอีในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มช.*, 38(4), 509-519.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสวามินี ธีระวุฒิ. (2554). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสันเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554. ชลบุรี.
- สุเมธชา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิต. (2547). *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. นครปฐม: สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน.

- โสภณ คงสำราญ, เชิดศักดิ์ ชีระบุตร, นงนุช ศรีปฐมสวัสดิ์, เผด็จ พลากรูร, พจนีย์ โกมลภิส, สมพร ศรียศชาติ, หวานจิตต์ เกร็นพงษ์, อมรรัตน์ สีสากรณ์ และอิทธิพันธ์ เจริญผล. (2524). *แบบที่เรียทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ: โครงการตำราศิริราช.
- อิสยา จันทรวิธานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. (2553). *แบบที่เรียทางการแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อุทัย แก้วเอียน. (2549). โพรไบโอติกส์. *วารสารสงขลานครินทร์เวชสาร*, 24(4), 315-323.
- อุษามาส จรรย์วานุกูล. (2548). การรอดชีวิตของโพรไบโอติกและการนำไปใช้ประโยชน์. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 25(1), 84-93.
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., and Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35, 177-183.
- Adwan, G., and Mhanna, M. (2009). Synergistic effects of plant extracts and antibiotics on *staphylococcus aureus* isolates isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 46-51.
- Adwan, G., Abu-Shanab, B., and Adwan, K. (2010). Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 266-269.
- Ahern, M., Verschuere, 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.
- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S.A., Alhadrami, H.A.A., and Bhandari, A. (2015). Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of *Piper nigrum* Linn fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 101-107.
- Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 403-406.
- 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.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. 17th ed. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Arbsuwan, N., Payoungkiattikun, W., Sirithorn, P., Daduang, S., Jangpromma, N., Dhiravisit, A., Hahm, Y.T., Neubert, L.K., and Klaynongsruang, S. (2017). Purification and characterization of macrolactins and amicoumacins from *Bacillus licheniformis* BFP011: a new source of food antimicrobial substances, *CyTA - Journal of Food*, doi: 10.1080/19476337.2017.1337047.
- Bajpai, V.K., Yoon, J.I., Bhardwaj, M., and Kang, S.C. (2014). Anti-listerial synergism of leaf essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* with nisin in whole, low and skim milks. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 602-608. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60102-4.
- BAM. (2002). BAM 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Retrieved September 2, 2017, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>.
- Bansal, A., Jones, T.M., Abd, S.J., Danyluk, M.D., and Harris, L.J. (2010). Most-probable-number determination of *Salmonella* levels in naturally contaminated raw almonds using two sample preparation methods. *Journal of Food Protection*, 73, 1986-1992.
- Bapela, N.B., Lall, N., Fourie, P.B., Franzblau, S.G., and van Rensburg, E.C.J. (2006). Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytomedicine*, 13, 630-635.
- Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2009). Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5451-5460.
- 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.
- Berić, T., Stanković, S., Draganić, M., Kojić, M., Lozo, J., and Fira, D. (2013). Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 502-510.

- Beuchat, L.R. (1994). Antimicrobial properties of spices and their essential oils. In: Dillon, V.M., and Board, R.G. (Eds.). pp. 167-179. *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. CAB Intl, Wallingford.
- Borowsky, L.M., Schmidt, V., and Cardoso, M. (2007). Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 544-546
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cichewicz, R.H., and Thorpe, R.H. (1996) The antimicrobial properties of chili peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 52, 61-70.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., and Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 251–256.
- Colakoglu, F.J., Sarmasik, A., and Koseoglu, B. (2006). Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. *Food Control*, 17, 648-652.
- Crandall, A.D., and Montville, T.J. (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 231–237.
- 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.
- Dischinger, J., Josten, M., Szekat, C., Sahl, H.G., and Bierbaum, G. (2009). Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS ONE* 4: e6788. DOI: 10.1371/journal.pone.0006788.
- Dorantes, L., Colmenero, R., Hernández, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernández, E., and Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 125-128.
- Ettayebi, K., El Yamani, J., and Rossi-Hassani, B. (2000). Synergistic effect of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letter*, 183, 191–195.
- Ewansiha, J.U., Garba, S.A., Mawak, J.D., and Oyewole, O.A. (2012). Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Lemon grass) and its phytochemical properties. *Frontiers in Science*, 2, 214-220.

- FDA. 1998. US food and drugs administration. 8th ed. Gaithersburg: AOAC International.
- Field, D., Daly, K., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2015). Efficacies of nisin A and nisin V semipurified preparations alone and in combination with plant essential oils for controlling *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 2762–2769.
- Ganjewala, D., Gupta, A.K., and Muhury, R. (2012). An update on bioactive potential of a monoterpene aldehyde citral. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2, 186-199.
- Ghalfi, H., Benkerroum, N., Doguiet, D. D., Bensaid, M., and Thonart, P. (2007). Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage. *Letter Applied Microbiology*, 44, 268–273.
- Gomaa, E.Z. (2013). Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 259-268.
- Grande, M. J., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martinez-Canamero, M., and Galvez, A. (2007). Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 70, 405–411.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 531-542.
- He, L., Chen, W., and Liu, Y. (2006). Production and partial characterization of bacteriocin like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbial Research*, 161, 321-326.
- 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.
- Jafari, B., Ebadi, A., Aghdam, B.M., and Hassanzade, Z. (2012). Antibacterial activities of lemon grass methanol extract and essence on pathogenic bacteria. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 12, 1042-1046.

- 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.
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Van Vuuren, S.F., and Van Zyl, R.L. (2006). *In vitro* evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*. *South African Journal of Botany*, 72, 634–637.
- 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.
- Kim, J., Marshal, M.R., and Wei, C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 4, 2839–2845.
- Ming, X., and Daeschel, M.A. (1995). Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 58, 416–420.
- Kumar, R., Surendram, P.K., and Thampuram, N. (2009). Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella* 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.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., and Del Nobile, M.A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3: 287. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>.
- 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.
- Naik, M.I., Fomda, B.A., Jaykumar, E., and Bhat, J.A. (2010). Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 535–538.

- Nascimento, P.L.A., Nascimento, T.C.E.S., Ramos, N.S.M., Silva, G.R., Gomes, J.E.G., Falcão, R.E.A., Moreira, K.A., Porto, A.L.F., and Silva, T.M.S. (2014). Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). *Molecules*, 19, 5434-5447.
- 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.
- 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.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T. and Bennett, B.C. (2009). Effects of extracts from Italian medicinal plant on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 418-428.
- 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.
- Shah, A.K.M.A., Tokunaga, C., Kurihara, H., and Takahashi, K. (2009). Changes in lipids and their contribution to the taste of *migaki-nishin* (dried herring fillet) during drying. *Food Chemistry*, 115, 1011-1018.
- Sikkema, J., De Bont, J., and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Review*, 59, 201-222.
- Sivaroban, T., Hettiarachchy, N. S., and Johnson, M. G. (2008). Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal of Food Protection*, 71, 2105-2109.
- Somolinos, M., Garcia, D., Condon, S., Mackey, B., and Pagan, R. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1928-1939.

- Sultanbawa, Y. (2011). Plant antimicrobials in food applications: mini review. In: Méndez-Vilas, A. (Eds.). *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, Volume 2, pp. 1084- 1093. Formatex Research Center, Badajoz, Spain.
- 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. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(2), 140-148.
- Tyagi, A.K., and Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22, 1707-1714.
- 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.