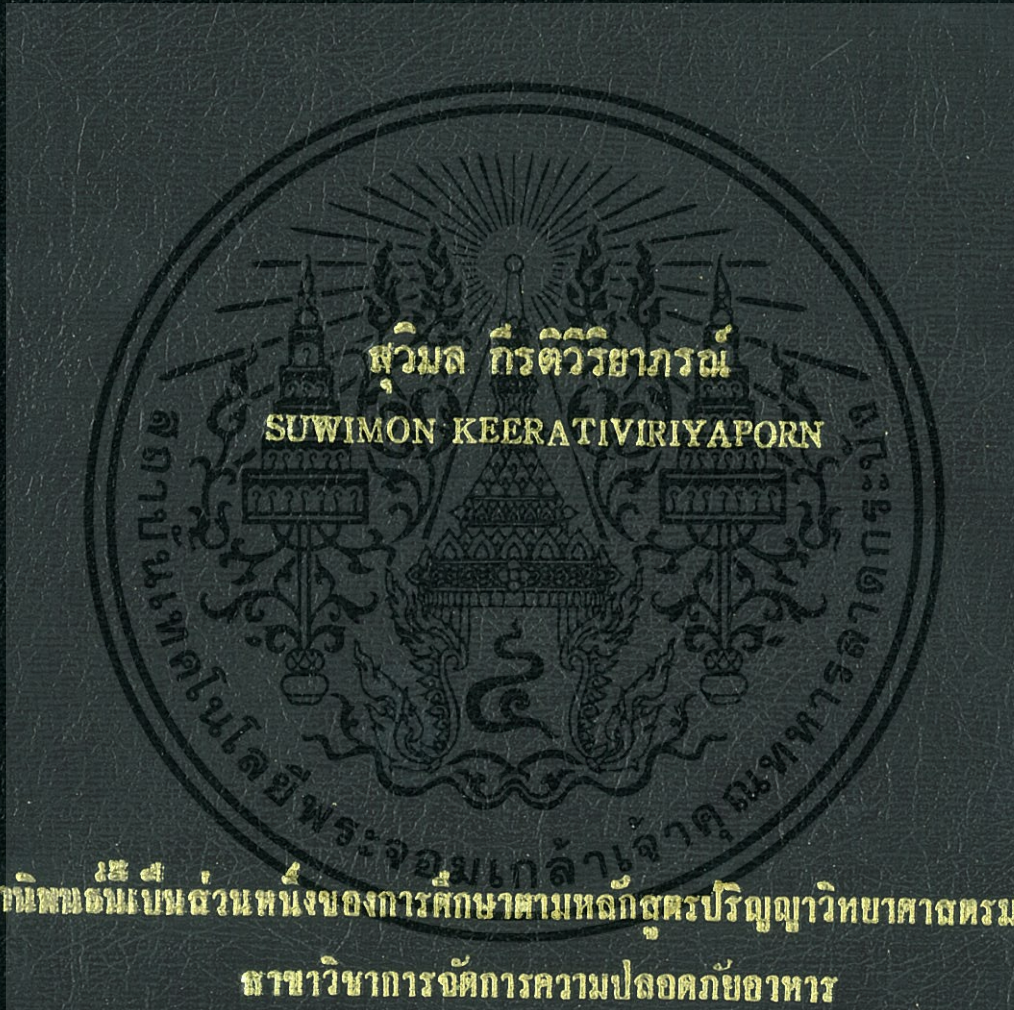


การทำนายการสร้างฮิสตามีนของเชื้อ *Morganella morganii*

ในปลาทูน่า Skipjack (*Katsuwonus pelamis*)

HISTAMINE PREDICTION OF *Morganella morganii*
IN SKIPJACK TUNA (*Katsuwonus pelamis*)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะเทคโนโลยีการประมงและอาหาร
สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-275

การทำนายการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ *Morganella morganii*
ในปลาทูน่า Skipjack (*Katsuwonus pelamis*)

HISTAMINE PREDICTION OF *Morganella morganii*
IN SKIPJACK TUNA (*Katsuwonus pelamis*)



T148025

สุวิมล กীরตวิริยาภรณ์

SUWIMON KEERATIVIRIYAPORN

สาขา.....
เลขทะเบียน 148025
ในเดือนปี 9 ต.ค. 2560

b. 12865606
.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-275

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**HISTAMINE PREDICTION OF *Morganella morganii*
IN SKIPJACK TUNA (*Katsuwonus pelamis*)**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2017

KMITL-2017-AI-M-054-275

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำนายการสร้างฮิสตามีนของเชื้อ *Morganella morganii* ในปลาทูน่า
Skipjack (*Katsuwonus pelamis*)
HISTAMINE PREDICTION OF *Morganella morganii* IN SKIPJACK
(*Katsuwonus pelamis*)

ชื่อนักศึกษา นางสาวสุวิมล กิระติวิริยาภรณ์
รหัสประจำตัว 56608023
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.วริพัทธ์ อารีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วริพัทธ์ อารีกุล	
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
ดร.สิทธิพงษ์ นลินานนท์	
ผศ.ดร.วราภา มหากาญจนกุล	

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 3 กรกฎาคม 2560 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป
สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปินศิริโรตม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 24 เดือน กค พ.ศ. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำนายการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ <i>Morganella morganii</i> ในปลาทูน่า Skipjack (<i>Katsuwonus pelamis</i>)
นักศึกษา	นางสาวสุวิมล กীরติวิริยาภรณ์
รหัสประจำตัว	56608023
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. วรพีศย์ อารีกุล

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อการเจริญของเชื้อ *Morganella morganii* DMST 15641 และปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาทูน่า แล้วจึงสร้างสมการทำนายการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีน โดยการนำปลาทูน่า Skipjack (*Katsuwonus pelamis*) แช่แข็งจากโรงงานผลิตทูน่ากระป๋องมาละลาย แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยสารละลายผสมของอะซีโตนและเอทานอล จากนั้นบดเนื้อปลา และ ผสมเชื้อ *M. morganii* ให้มีปริมาณเริ่มต้น 10^2 (ต่ำ) และ 10^5 (สูง) CFU ต่อกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อทั้งหมดและปริมาณฮีสตามีนตามระยะเวลาต่าง ๆ ผลการศึกษา พบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) สูงกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นสูงในทุกๆ อุณหภูมิ โดยมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0219 – 0.1068 และ 0.0041 – 0.0424 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ อีกทั้ง การใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นสูงจะเข้าสู่ระยะ log phase และปริมาณฮีสตามีนก็เพิ่มขึ้นจนถึงระดับไม่ปลอดภัยรวดเร็วกว่าการใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นต่ำอีกด้วย นอกจากนี้ ยังพบว่าการบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นถึง 8,086 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และยังพบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและสร้างฮีสตามีน โดยการเพิ่มอุณหภูมิทำให้มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีน

เมื่อใช้สมการถดถอยในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับการเจริญของเชื้อ และปริมาณฮีสตามีน พบว่า สมการทางคณิตศาสตร์แบบเอกซ์โพเนนเชียล มีความเหมาะสม เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนาย (standard error of estimate: SEE) ยกเว้นปริมาณฮีสตามีนในการบ่มเนื้อปลาที่เติมเชื้อเริ่มต้น 10^2 CFU ต่อกรัมที่มีรูปแบบสมการเป็นแบบโพลินอเมียลยกกำลังสาม (cubic) โดยสมการที่ได้มีค่า R^2 สูงกว่า 0.684 และมีค่า SEE ต่ำกว่า 86.5 และมีบางสถานะที่ไม่สามารถคำนวณหาสมการถดถอยได้ สำหรับการคำนวณหาสมการโลจิสติก

แบบตัวแปรร่วมระหว่างเวลาในการบ่มและปริมาณเชื้อ สำหรับปริมาณฮีสตามีนนั้น มีเพียงสภาวะการใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูง บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และเจริญจนถึงระยะ log phase เท่านั้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Histamine prediction of <i>Morganella morganii</i> in skipjack tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>)
Student	Ms. Suwimon Keerativiriyaporn
Student ID	56608023
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Varipat Areekul
Year	2017

ABSTRACT

The objectives of this research were to study effect of temperature and storage time on the growth of *Morganella morganii* DMST 15641 and histamine formation in tuna meat. The mathematic equations were further developed to predict its growth and histamine content. Frozen skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) were collected from the tuna cannery, thawed, sterilized with ethanol-acetone (1:1, v/v), and then grounded into mince. The minced fish was inoculated with *M. morganii* to reach a concentration of 10^2 and 10^5 CFU/g, and incubated at 15, 25 and 35 °C. The total plate count and histamine content were analyzed at each time intervals. The results showed that the maximum specific growth rate (μ_{max}) of low initial load bacteria was higher than that of high initial load in all temperatures with the range of 0.0219 – 0.1068 and 0.0041 – 0.0424 h⁻¹, respectively. In addition, high initial load more rapidly reached log phase, consequently, faster exceeded the unsafe level of histamine content than low initial load. Besides, Incubation at 25 °C for 24 hours allowed histamine to increase up to 8,086 mg/kg. In addition, temperature is an important factor on the bacterial growth and histamine formation. The increase of temperature resulted in the increase of growth rate of the bacteria and histamine development.

The regression analysis were determined for estimating the relationship between the independent variable (incubation time) and dependent variables (microbial growth and histamine content). It was found that both dependent variables fitted the exponential mathematics. When considering the coefficient of determination (R^2) and standard error of estimate (SEE) as criteria, most equations fitted with the exponential equation, except cubic equation better fitted the histamine forming in samples with the initial load of 10^2 CFU/g. The R^2 of all equations were higher than 0.684 and the SEE were lower than 86.5. There were some conditions that were not

able to calculate the regression equation. The calculation of logistic equation for histamine content from two variables; incubation time and microbial count, only showed a suitable prediction equation for condition of high initial load bacteria incubated at 25 °C and reached the log phase.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วริพัทธ์ อารีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำการวางแผนการทดลอง รวมทั้งแนะนำแนวคิดต่าง ๆ เพื่อแก้ไขปัญหาและอุปสรรคในระหว่างการทดลอง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ ดร.สิทธิพงษ์ นลินานนท์ และผศ. ดร.วราภา มหากาญจนกุล ที่ช่วยให้คำแนะนำ ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง สมุทรสาคร กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง กรมประมง ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวจริยา ภูเจริญ นางสาวสุรินทร์พร ยิ้มกัน นางศิริเนตร ขุนทอง นางอรวรรณ หลายประดิษฐ์ นางสาวรัตติยา พรหมขำ นักวิชาการผลิตภัณฑ์อาหาร ศูนย์ฯ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณบริษัทเซ้าท์อีสต์เอเชียนแพคเกจจิ้งแอนด์แคนนิ่ง จำกัด สมุทรสาคร ที่เอื้อเฟื้อวัสดุดิบปลาทูน่าแช่แข็งในการศึกษา

ขอขอบคุณน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาเอก ปริญญาโท นางสาวปิยวรรณ อยู่ดี นางสาวนิพิชฌน์ อภิภูวสุขเจริญ นายมหัทธน ทวีฤกษ์ขวัญ และนายวินธีรวิช ชนเสษณ์สุนทร ที่ช่วยเหลือและให้ความรู้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ และดูแลงานเอกสารต่าง ๆ

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณมารดา และพี่สาว รวมถึงครูอาจารย์ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือ อีกทั้งให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านแก่ข้าพเจ้า

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับมารดาซึ่งเป็นที่ยรักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

สุวิมล กীরตวิริยาภรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ฮีสตามีน.....	4
2.2 แหล่งของฮีสตามีน.....	6
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในปลา.....	8
2.3.1 กรดอะมิโนอิสระ ฮีสทิดีน.....	8
2.3.2 แบคทีเรียที่สร้างเอ็นไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส.....	10
2.3.3 สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญ.....	15
2.3.4 การเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน.....	18
2.4 การเก็บรักษาและอุณหภูมิ.....	20
2.5 อุบัติการณ์การเกิดพิษฮีสตามีน.....	22
2.6 มาตรฐานฮีสตามีนของประเทศต่าง ๆ.....	24
2.6.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์.....	24
2.6.2 มาตรฐานการผลิต.....	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 วิธีการตรวจวิเคราะห์ฮีستามีน.....	28
2.8 สมการทำนายทางคณิตศาสตร์.....	29
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	34
3.1 วัสดุคืบ.....	34
3.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	34
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	34
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	35
3.5 วิธีการทดลอง.....	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล.....	40
4.1 การเปลี่ยนแปลงของปลาทูน่าที่เติมเชื้อ <i>M. morgani</i> ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ.....	40
4.2 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญของ <i>M. morgani</i> ในปลาทูน่าห้องแถบ.....	41
4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ <i>M. morgani</i> ในปลาทูน่าห้องแถบ.....	43
4.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการสร้างฮีستามีนในปลาทูน่าห้องแถบ.....	47
4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างฮีستามีนในปลาทูน่าห้องแถบ.....	50
4.6 สมการการเจริญของเชื้อและการสร้างปริมาณฮีستามีน.....	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	63
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	63
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	64
บรรณานุกรม.....	65

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	74
ภาคผนวก ก วิธีการทดสอบฮีสตามีนด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก.....	74
ภาคผนวก ข วิธีการทดสอบฮีสตามีนด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก AOAC (2015).....	75
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานฮีสตามีน (standard curve).....	79
ภาคผนวก ง ผลการตรวจจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g) ในตัวอย่าง เนื้อปลา.....	80
ภาคผนวก จ ผลการตรวจยืนยันความบริสุทธิ์ของ <i>Morganella morganii</i>	81
ภาคผนวก ฉ การเจริญของเชื้อ <i>M. morganii</i> ในเนื้อหมู่นำบดที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส.....	82
ภาคผนวก ช การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ <i>M. morganii</i> ใน เนื้อหมู่นำบด.....	83
ประวัติผู้เขียน.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณฮีสทีดินในปลาชนิดต่างๆ.....	9
2.2	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮีสทีดินดีคาร์บอกซิเลสในปลา.....	11
2.3	มาตรฐานฮีสตามีนในสินค้าประมง.....	25
2.4	ระยะเวลาที่ควรแช่เย็นปลาที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการสร้างฮีสตามีน ในปลาที่มาจากน้ำและอากาศอุณหภูมิต่าง ๆ...	26
2.5	ระยะเวลาสูงสุด (ชั่วโมง) ที่ปลาจะอยู่ได้โดยไม่เพิ่มฮีสตามีน.....	27
4.1	ลักษณะปรากฏของเนื้อทูน่าบด บ่มที่อุณหภูมิ 35, 25 และ 15 องศาเซลเซียส.	41
4.2	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของเชื้อที่อุณหภูมิ 35, 25 และ 15 องศาเซลเซียส.....	46
4.3	สมการทำนายการเจริญของเชื้อ <i>M. organii</i> DMST 15641 ในปลาที่เชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม.....	55
4.4	สมการทำนายการเจริญของเชื้อ <i>M. organii</i> DMST 15641 ในปลาที่เชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม.....	56
4.5	สมการทำนายปริมาณฮีสตามีนในปลาที่เติมเชื้อ <i>M. organii</i> เริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	58
4.6	สมการทำนายปริมาณฮีสตามีนในปลาที่เติมเชื้อ <i>M. organii</i> เริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	60
4.7	สรุปสมการทำนายการเจริญของเชื้อและปริมาณฮีสตามีนในเนื้อทูน่าบด.....	61
4.8	ปริมาณฮีสตามีน (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่ได้จากการทำนายและจากการตรวจวิเคราะห์จริงในปลาที่เติมเชื้อ <i>M. organii</i> เริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	62

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การเปลี่ยนแปลงจากฮีสทีดินเป็นฮีสตามีน โดยเอนไซม์ฮีสทีดินดีคาร์บอกซิเลส	5
3.1 ปลาทูน่าท้องแถบ (skipjack: <i>Katsuwonus pelamis</i>) ละลายแล้ว.....	34
4.1 การเจริญของ <i>M. morgani</i> ในปลาทูน่าท้องแถบที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2 log CFU ต่อกรัม และ 5 log CFU ต่อกรัม บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส.....	41
4.2 การเจริญของ <i>M. morgani</i> ในปลาทูน่าท้องแถบ ที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2 log CFU ต่อกรัม และ 5 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส.....	44
4.3 ผลของปริมาณเชื้อตั้งต้นที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีน ในปลาทูน่าท้องแถบบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส.....	47
4.4 การเจริญของเชื้อ <i>M. morgani</i> และ การสร้างปริมาณฮีสตามีน ในปลาที่บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส.....	50
4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีน ในปลาทูน่าท้องแถบที่มีเชื้อตั้งต้น 2 log CFU ต่อกรัม และ 5 log CFU ต่อกรัม	51

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ฮิสตามีนเป็นเอมีนที่พบได้ในอาหารหลายชนิด รวมทั้งผลิตภัณฑ์ปลา โดยเฉพาะปลาที่มีเนื้อสีคล้ำ (dark meat fish) ฮิสตามีนเกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซีเลสที่สร้างโดยแบคทีเรีย กับกรดอะมิโนฮิสทีดีนในอาหาร เมื่อปริมาณฮิสตามีนเข้าไปในปริมาณมาก จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยเนื่องจากโรคอาหารเป็นพิษ (Histamine food poisoning) ที่เรียกว่า Scombroid poisoning ได้ โดยทำให้เกิดอาการแพ้ เช่น ผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน แสบร้อนและชาในช่องปาก (Stratton and Taylor, 1991)

แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซีเลสได้ ส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Raoultella planticola* และ *Hafnia alvei* เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้พบทั่วไปในบริเวณเหงือก ผิวหนัง และเมือกปลา (Taylor, 1985; Kim et al., 2009) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซีเลสหรือการสร้างฮิสตามีนอยู่ระหว่าง 20-30 °C และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง เมื่ออุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษาลดลง

ปลาที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดฮิสตามีน ส่วนใหญ่เป็นปลาที่อยู่ในวงศ์ Scombridae เช่น ทูน่า และแม็กเคอเรล ซึ่งเป็นปลาที่มีฮิสทีดีนอิสระสูง อย่างไรก็ตาม โดยธรรมชาติ ปลาสดจะมีฮิสตามีนอยู่แล้วแต่มีในปริมาณต่ำประมาณ 1-5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Frank, 1985; Kerr et al., 2002) ปริมาณฮิสตามีนที่สูงเพิ่มขึ้นในภายหลัง เกิดจากการดูแลรักษาอุณหภูมิปลาหลังการจับ (post-harvested handling) ตั้งแต่ในเรือประมง การขนส่ง และการผลิตในโรงงาน ไม่เหมาะสม ทำให้เกิดสถานะเอื้ออำนวยต่อการเจริญของแบคทีเรีย และการเพิ่มขึ้นของฮิสตามีนในที่สุด ประเทศต่าง ๆ จึงใช้ปริมาณฮิสตามีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาและสุขลักษณะในการผลิต โดยกำหนดมาตรฐานปริมาณฮิสตามีนที่ให้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา อาทิเช่น สหรัฐอเมริกาคำหนด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สหภาพยุโรปกำหนดให้ตรวจตัวอย่าง 9 ตัวอย่างย่อย โดยทุกตัวอย่างต้องไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และให้พบมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ 2 ตัวอย่าง ($N = 9$, $M = 200$, $m = 100$, $C = 2$) (กรมประมง, 2558) ทั้งนี้ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค

สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์ทูน่าบรรจุกระป๋องไปยังประเทศต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก กรมประมงได้มีข้อกำหนด เรื่องสุขลักษณะการผลิตผลิตภัณฑ์ประมงบรรจุ

ภาชนะปิดสนิทและสุกลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาทูน่า (กรมประมง, 2552) และระบบการควบคุมคุณภาพ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) (กรมประมง, 2555) สำหรับให้โรงงานปฏิบัติ เพื่อไม่ให้ปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจนเกินมาตรฐานที่ประเทศผู้ค้ากำหนด โดยกำหนดให้ควบคุมตั้งแต่ปริมาณฮีสตามีนในวัตถุดิบปลาที่รับเข้า และควบคุมอุณหภูมิและเวลาในระหว่างกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตาม ในระยะ 3 ปีที่ผ่านมา สหรัฐอเมริกาโดยองค์การอาหารและยา (US Food and Drug Administration) ได้เข้มงวดการปฏิบัติตามมาตรการการควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ทูน่ากระป๋องมากขึ้น โดยกำหนดให้อุณหภูมิของปลาสดในระหว่างกระบวนการผลิตต้องต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส หรือหากปลาทูน่าที่ผลิต อยู่ในสภาวะอุณหภูมิห้องที่สูงกว่า 21 องศาเซลเซียส ต้องใช้ระยะเวลาการผลิตจนถึงขั้นตอนการเปิดไอน้ำในหม้อฆ่าเชื้อภายใน 12 ชั่วโมง (FDA, 2011)

วัตถุดิบปลาที่โรงงานใช้ ส่วนใหญ่เป็นปลาแช่แข็งนำเข้าจากต่างประเทศ อุณหภูมิใจกลางปลาที่เก็บในห้องเย็นเพื่อรอการผลิตประมาณ -16 ถึง -18 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาผลิต ต้องละลายปลาทั้งตัวในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 21 องศาเซลเซียส จนได้อุณหภูมิใจกลางปลา -1 ถึง 2 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลามากกว่า 4 ชั่วโมง ทั้งนี้ ขึ้นกับขนาดของตัวปลา หลังจากนั้น นำปลามาผ่าท้อง ควักไส้ ที่อุณหภูมิห้อง นึ่งปลาให้สุก (อุณหภูมิหม้อหนึ่ง 95 - 100 องศาเซลเซียส) เมื่อนึ่งสุกแล้ว จึงทำให้อุณหภูมิลดลงโดยใช้น้ำสเปรย์ แล้วจึงชุบน้ำปลาและเนื้อให้สะอาด บรรจุเนื้อปลาลงกระป๋อง (อุณหภูมิห้องผลิตประมาณ 25 องศาเซลเซียส) โดยใช้ระยะเวลานับจากหลังปลาละลายจนถึงขั้นตอนสุดท้ายรวมทั้งหมด 14 ชั่วโมง ดังนั้น กระบวนการผลิตทูน่ากระป๋องโดยทั่วไป ซึ่งผลิตในอุณหภูมิห้องที่สูงกว่า 21 องศาเซลเซียส จึงใช้ระยะเวลามากกว่า 12 ชั่วโมงตามข้อกำหนดของประเทศสหรัฐอเมริกา อีกทั้ง การตรวจวิเคราะห์ฮีสตามีนต้องใช้เวลา และห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือวิเคราะห์เหมาะสม รวมทั้งบุคลากรที่ต้องผ่านการฝึกอบรม ปัจจุบันจึงมีการจัดทำแบบทำนาย (Predictive model) การสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อใช้คาดการณ์ปริมาณฮีสตามีนที่เกิดขึ้น หากปลาอยู่ในอุณหภูมินั้นนาน ในช่วงระยะเวลาที่กำหนด

การศึกษานี้จึงมุ่งหาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อการเจริญของเชื้อ *Morganella morganii* และการสร้างปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาทูน่า ซึ่ง *M. morganii* เป็นเชื้อที่สร้างฮีสตามีนได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปสร้างสมการทางคณิตศาสตร์ สำหรับอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้น เพื่อทำนายปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ภายใต้สภาวะต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นตามกระบวนการผลิตของโรงงานในประเทศไทย โดยเฉพาะ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต เพื่อสามารถนำไปใช้ในการยืนยันและประเมินความปลอดภัยของฮีสตามีนตามที่กำหนดไว้ในกฎหมาย หรือใช้ในการกำหนดแนวทางการปฏิบัติของผู้ประกอบการให้สามารถปฏิบัติตามได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

การสร้างสมการในการทำนายการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีนในเนื้อปลาทูน่า จาก ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิ และ เวลา ที่ศึกษา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนในเนื้อปลาทูน่า โดยการใส่เชื้อ *Morganella morganii* ในปริมาณเริ่มต้น 2 ระดับ ได้แก่ 10^2 และ 10^7 CFU ต่อกรัม เก็บรักษาที่ อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ ในระยะเวลาต่าง ๆ แล้ววิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนด้วยวิธีฟลูออโร เมตริก และนับจำนวนเชื้อ *M. morganii* ที่เพิ่มขึ้นด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด นำผลที่ ได้มาสร้างเป็นสมการทำนาย สำหรับอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับปริมาณ ฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นในปลาทูน่า skipjack



บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฮีสตามีน

ฮีสตามีนเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จากโครงสร้างทางเคมีจัดเป็นอะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) ชนิดหนึ่ง (ภาพที่ 2.1) ฮีสตามีนพบได้ในอาหารหลายชนิด (Ruiz-Capillas and Jimenez-Colmenero, 2010) และร่างกายยังสามารถสร้างขึ้นมาเองได้ โดยการกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้หรือสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ เมื่อร่างกายถูกกระตุ้น ฮีสตามีนจะหลั่งออกมาจากแมสต์เซลล์ (mast cell) และจับกับ histamine receptors ในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ระบบโลหิต และระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้แสดงอาการแพ้ (Lehane and Olley, 2000) อย่างไรก็ตาม ฮีสตามีนที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปลี่ยนเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และถูกกำจัดออก การแสดงอาการจึงเกิดขึ้นน้อย แต่ฮีสตามีนที่มาจากการบริโภคอาหารหากมีปริมาณมาก จะไม่สามารถถูกย่อยสลายด้วยกระบวนการย่อยดังกล่าว จึงแสดงอาการเจ็บป่วยได้มากกว่า (Lum, 2012)

ฮีสตามีนที่อยู่ในอาหาร ซึ่งเป็นสารประกอบเอมีนหรือไบโอเจนิคเอมีนที่ไม่ระเหย (non-volatile amine) ถูกสร้างจากกระบวนการดีคาร์บอกซิไลเซชัน (decarboxylation) ออกจากฮิสทีดีนอิสระในอาหาร โดยเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลส ทำให้ฮิสทีดีนเปลี่ยนรูปเป็นฮีสตามีน (Baylis, 2006) มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_5H_9N_3$ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (Shaw, 2013) ฮีสตามีนเป็นสารที่ละลายน้ำได้ จึงไม่พบในผลิตภัณฑ์น้ำมันปลา (FDA, 2011) นอกจากนี้เป็นสารที่ทนความร้อน จึงไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนระดับที่ใช้ในการประกอบอาหารทั่วไป การรมควันแบบร้อน หรือการฆ่าเชื้ออาหารกระป๋อง อีกทั้งไม่ถูกทำลายด้วยความเย็นระดับแช่แข็งเช่นกัน (Lehane and Olley, 2000)

การแสดงอาการแพ้ของฮีสตามีนเป็นการเกิดพิษทางเคมี จึงทำให้ร่างกายแสดงอาการอย่างรวดเร็วตั้งแต่หลังจากบริโภคอาหารไม่กี่นาทีจนถึงหลายชั่วโมง โดยขึ้นกับความไวในการรับพิษของแต่ละบุคคล อาจแสดงอาการอย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน ทางผิวหนัง (ผื่นคัน ลมพิษ ผิวหนังอักเสบ) ระบบทางเดินอาหาร (คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง) ระบบการไหลเวียนโลหิต (ชีพจรเต้นเร็วและอ่อน ความดันโลหิตต่ำ) และระบบประสาท (ปวดศีรษะ ตัวสั่น แสบร้อนและชาในช่องปาก กลืนยาก) (Taylor *et al.*, 1984; Stratton and Taylor, 1991) อาการดังกล่าวอาจหายได้เองภายใน 24 ชั่วโมง (Stratton and Taylor, 1991) และมีส่วนน้อยที่แสดงอาการหลายวัน หรือจำเป็นต้องเข้ารับการรักษาในสถานพยาบาล (McLauchlin *et al.*, 2005)



ภาพที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงจากฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน โดยเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส

การบริโภคอาหารที่มีฮีสตามีน จะทำให้มีโอกาสเป็นพิษมากกว่าการรับสารฮีสตามีนบริสุทธิ์โดยตรงทางปาก โดย Taylor *et al.* (1984) ได้อธิบายว่า ฮีสตามีนบริสุทธิ์จะถูกเผาผลาญ (metabolized) ในผนังลำไส้ หรือตับของคน ทำให้แสดงอาการเป็นพิษไม่รุนแรง แม้ว่าจะรับสารพิษนี้เข้าไปในปริมาณสูง ในขณะที่ฮีสตามีนที่รับเข้าทางอาหารในปริมาณเดียวกันนี้ จะทำให้เป็นพิษรุนแรงมากกว่า โดยเชื่อว่าอาจเนื่องมาจากมีไบโอเจเนติกเอมีน อื่น ๆ เช่น คาร์ดาวารีน หรือสารตัวอื่น ร่วมทำปฏิกิริยาด้วย จึงทำให้มีความเป็นพิษรุนแรงกว่า

Shalaby (1996) ได้ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของฮีสตามีนและไบโอเจเนติกเอมีนตัวอื่น ๆ ที่ได้รับสัมผัสทางปากโดยตรง และได้ให้ข้อแนะนำระดับความปลอดภัยในการบริโภคปลาที่มีปริมาณฮีสตามีน ดังนี้

< 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	ปลอดภัยต่อการบริโภค (safe for consumption)
50 - 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพิษ (possibly toxic)
200 - 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	อาจจะเป็นพิษ (probably toxic)
> 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	เป็นพิษและไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค (toxic and unsafe for human consumption)

แม้ว่าปัจจุบัน ยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดเกี่ยวกับระดับฮีสตามีนที่รับเข้าไปในร่างกายแล้วทำให้เกิดอาการเป็นพิษ แต่มีรายงานระบุว่าระดับต่ำสุดของฮีสตามีนที่จะทำให้เกิดอาการ คือ 100 mg/dL (Jay *et al.*, 2005) การทดสอบการรับสารฮีสตามีนทางปากโดยตรง เพื่อสังเกตอาการปวดศีรษะ ผื่นแดงบริเวณใบหน้า ในผู้ทดสอบที่มีสุขภาพดี 66 คน และผู้ที่มีความไวในการรับพิษ 74 คน พบว่า ผู้ที่มีสุขภาพดีบางคนไม่แสดงอาการ แม้จะรับฮีสตามีน 300 มิลลิกรัม หรือ 6 เท่าของ 50 มิลลิกรัม เช่นเดียวกันกับผู้ที่มีความไวบางคน ก็ไม่แสดงอาการ เมื่อได้รับฮีสตามีน 120 มิลลิกรัม หรือ 2.4 เท่าของ 50 มิลลิกรัม ผลการศึกษาดังกล่าว ได้แนะนำให้ใช้ NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) ที่ 50 มิลลิกรัม สำหรับการแสดงอาการปวดศีรษะและผื่นแดงบนใบหน้า อย่างไรก็ตาม มีการแนะนำให้ใช้ระดับ 50 มิลลิกรัม เป็นระดับ acute reference dose (ARfD) ของผู้ที่มีสุขภาพดี (EFSA, 2011) ต่อมาองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนามัยโลก ได้จัดประชุมร่วมผู้เชี่ยวชาญ เพื่อหารือทางด้านความเสี่ยงต่อสุขภาพของฮิสตามีน และไบโอเจนิคเอมีนชนิดอื่นในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ (FAO/WHO Expert Meeting on Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products) ที่ประชุม ได้แนะนำให้ใช้ NOAEL ที่ 50 มิลลิกรัม เช่นกัน และกำหนด dose response ที่ระดับเดียวกับ NOAEL ต่อ 1 มื้ออาหาร โดยให้ 1 มื้ออาหารเท่ากับ 250 กรัม ซึ่งเมื่อคำนวณปริมาณฮิสตามีน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร 250 กรัม แล้ว จะให้ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของปลา (FAO/WHO, 2013)

2.2 แหล่งของฮิสตามีน

อาหารที่มีรายงานว่าพบฮิสตามีน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อ ไช้ เนยแข็ง ถั่วเหลือง เบียร์ และไวน์ (Saaid *et al.*, 2009) แต่การเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากฮิสตามีน (Histamine poisoning) ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการบริโภคปลาที่มีปริมาณฮิสตามีนสูง ฮิสตามีนจึงเป็นไบโอเจนิคเอมีนที่สำคัญและพบมากในปลา และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ รายงานการตรวจพบปริมาณฮิสตามีนในปลาที่จำหน่ายในประเทศต่าง ๆ เช่น Nahla and Farag (2005) ตรวจสอบฮิสตามีนในปลาท้องถิ่น (โกลาย ชาร์ดีน ปลากระบอก) และนำเข้า (โกลาย ชาร์ดีน แม็กเคอเรล) จากตลาด Port-Said ประเทศอียิปต์ ทั้งหมด 180 ตัวอย่าง พบปริมาณฮิสตามีน ตั้งแต่ 4 ถึง 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยปลาท้องถิ่นพบฮิสตามีนในโกลาย 180 – 260 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มากกว่าชาร์ดีน และปลากระบอก ส่วนปลานำเข้าพบในแม็กเคอเรล 390-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มากกว่า โกลาย และชาร์ดีน ยังมีรายงานฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาที่จำหน่ายในประเทศไต้หวัน โดย Tsai *et al.* (2005a) ศึกษาปริมาณฮิสตามีนในปลาแม็กเคอเรลเค็มจำนวน 36 ตัวอย่าง จากตลาดค้าปลีกต่างๆ ในประเทศไต้หวัน พบว่า ปริมาณฮิสตามีนอยู่ในช่วง <math><1 - 120</math> มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมี 2 ตัวอย่างที่ฮิสตามีนสูงกว่าที่กฎหมายกำหนด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมคือ 70 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อมา Saaid *et al.* (2009) ศึกษาปริมาณไบโอเจนิคเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารที่จำหน่ายในประเทศมาเลเซีย 62 ตัวอย่าง โดยมีทั้งผลิตภัณฑ์ปลาและผัก พบว่า น้ำนูดูจากปลากระดักมีปริมาณฮิสตามีนสูงสุด 373 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปลาแม็กเคอเรลกระป๋องพบ 56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทูน่ากระป๋อง 2-18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ในผักกระป๋องไม่พบฮิสตามีนแต่อย่างใด

นอกจากนี้ Park *et al.* (2010) รายงานการสำรวจปริมาณไบโอเจนิคเอมีน 12 ชนิดรวมทั้งฮิสตามีนในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่วางจำหน่ายที่ตลาดค้าปลีกในประเทศสาธารณรัฐเกาหลี จำนวน 380 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลากระดัก แม็กเคอเรล แฮร์ริง แซลมอน และทูน่า พบว่า ปลากระดักมีฮิสตามีนสูงสุด 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาเป็นแม็กเคอเรล 39.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แฮร์ริง 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แซลมอน 13.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทูน่า 5.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

และ Huang *et al.* (2010) ได้ศึกษาปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้ง ที่จำหน่ายในประเทศไต้หวัน โดยการเก็บตัวอย่างจากตลาดขายปลีกบนเกาะ Penghu จำนวน 46 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาแม็กเคอเรล ปลาหูฉลาม และปลาข้างเหลือง เป็นต้น พบว่าร้อยละ 30.4 (14 ตัวอย่าง) มีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยตรวจพบฮีสตามีนทั้งหมดอยู่ระหว่าง <math><1 - 470</math> มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Naila *et al.* (2011) ศึกษาปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเนื้อทูน่าไปต้มเพื่อทำทูน่าแห้ง แล้วนำน้ำต้มนี้มาเคี่ยวจนเข้มข้น ที่เรียกว่า Rihaakuru ของประเทศมัลดีฟส์ พบว่าปริมาณฮีสตามีนใน Rihaakuru มีตั้งแต่ไม่พบจนถึง 5,487 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม Silva *et al.* (2011) ศึกษาฮีสตามีนในทูน่าสดและบรรจุกระป๋อง 414 ตัวอย่าง จากตลาดค้าส่งและปลีกของประเทศบราซิล พบว่าปริมาณฮีสตามีนในปลาสดจากตลาดค้าส่งและค้าปลีกอยู่ในช่วง ไม่พบจนถึง 70.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไม่พบจนถึง 5.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ปลากระป๋องมีตั้งแต่ไม่พบจนถึง 83.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อมา Yesudhasan *et al.* (2013) รายงานผลการสำรวจปริมาณฮีสตามีนในปลาที่อยู่ในกลุ่มสคอมบรอยด์ (scombroid fish) เช่น ทูน่า แม็กเคอเรล และไม่ใช่สคอมบรอยด์ (non-scombroid fish) เช่น ชาร์ดีน ครีอกเกอร์ กระดัก ของประเทศไอมานรวม 1,133 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นปลาสด (378) ปลาแช่แข็ง (441) ปลากระป๋อง (290) และปลาแห้ง (24) พบว่า ทูน่าทั้งสดและบรรจุกระป๋องมีฮีสตามีนสูงสุดที่ 229 และ 248 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือปลากระดักแห้ง 219 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปลาที่ไม่ใช่กลุ่มสคอมบรอยด์อื่น ๆ มีค่าฮีสตามีนสูงสุดในช่วง 2 – 69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Koral *et al.* (2013) รายงานผลการศึกษาปริมาณไบโอเจนิคเอมีนในผลิตภัณฑ์ปลาเค็มต่าง ๆ 78 ตัวอย่าง ของตุรกีและที่นำเข้าจากประเทศอื่น ๆ ในกลุ่มสหภาพยุโรป พบว่าฮีสตามีนในปลากระดักแล่นน้ำเกลือ ปลากระดักในน้ำมัน โอลายเค็ม และชาร์ดีนเค็ม อยู่ในช่วงตั้งแต่ <math><0.85 - 421.7</math> มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบฮีสตามีนสูงสุดในปลากระดักในซอสสมุนไพร ส่วนสหภาพยุโรปรายงานผลการตรวจฮีสตามีนในสินค้านำเข้าจากประเทศต่าง ๆ ระหว่าง พ.ศ. 2545 - 2553 พบว่า ฮีสตามีนเกินมาตรฐานจำนวน 315 รายการ โดยเป็นผลิตภัณฑ์ทูน่า 201 รายการ หรือคิดเป็นร้อยละ 63 ของตัวอย่างที่เกินมาตรฐานทั้งหมด (Leuschner *et al.*, 2013)

นอกจากนี้ มีรายงานพบฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์พืชเช่นกัน เช่น มิโซ ซึ่งศึกษาโดย Kung *et al.* (2007) โดยสุ่มตรวจมิโซจากตลาดค้าปลีกและซูเปอร์มาร์เก็ตในไต้หวัน พบว่า มีปริมาณฮีสตามีน ตั้งแต่ไม่พบจนถึง 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในปลา

Stratton *et al.* (1991) กล่าวว่า การสร้าง ไบโอเจนิคเอมีน ในอาหารต้องมียังประกอบที่สำคัญ 4 ส่วน อันได้แก่ กรดอะมิโนอิสระ แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญ และการเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซีเลชัน ดังนั้น ในการเกิดฮีสตามีน จำเป็นต้องมียังประกอบ ดังนี้

2.3.1 กรดอะมิโนอิสระ ฮีสทิดีน

ฮีสทิดีน เป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการเกิดฮีสตามีน เป็นกรดอะมิโน (amino acid) ที่พบมากในอาหารทะเล โดยเฉพาะปลา มีสมบัติเป็นด่าง เนื่องจากในโมเลกุลของฮีสทิดีนมีหมู่ NH_2 มากกว่า 1 หมู่ ฮีสทิดีนอิสระนี้มาจากผลของกระบวนการย่อยสลายตัวเองในระหว่างการเสื่อมเสียของปลา โดยจะเกิดขึ้นในระยะหลังการเกร็งตัว (post rigor) เมื่อปลาดตาย การไหลเวียนของเลือดหยุดชะงัก กระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) หยุดลง เอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลาจำนวนมากในกระเพาะ ลำไส้ และอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์น้ำ ซึ่งมีประสิทธิภาพสามารถย่อยกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำได้ จึงย่อยสลายโปรตีนของสัตว์น้ำ ได้ฮีสทิดีนอิสระจำนวนมาก (EFSA, 2011) ปลาทะเลหลายชนิดจึงทำให้เกิดอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีนได้ หากมีการดูแลรักษาหลังการจับไม่เหมาะสม ทำให้กระบวนการย่อยสลายตัวเองของปลาเกิดเร็วขึ้น

องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO/WHO, 2013) รายงานว่า ปลาที่สร้างฮีสตามีนได้มีทั้งหมด 19 วงศ์ 71 สกุล และ 111 ชนิด เนื่องจากปลาเหล่านี้เป็นปลาที่มีปริมาณฮีสทิดีนสูง (ตารางที่ 2.1) เช่น วงศ์ Scombridae, Scomberesocidae, Clupeidae และ Engraulidae โดยปลาในวงศ์ Scombridae ที่มีปริมาณฮีสทิดีนสูงที่สุด คือ ทูน่าทองแถบ (Skipjack: *Katsuwonus pelamis*) 13,400 - 20,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแม็กเคอเรล 14,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้น ปลาทูน่าทองแถบ และปลาแม็กเคอเรล ซึ่งเป็นปลาที่มีฮีสทิดีนสูงและมีการบริโภคมากกว่าปลาชนิดอื่น ๆ จึงมักเกี่ยวข้องกับรายงานการเกิดพิษในผู้บริโภค ในขณะที่ปลาในวงศ์ Scombridae บางชนิดซึ่งมีฮีสทิดีนปริมาณน้อยกว่า เช่น ทูน่าครีบน้ำเงิน (Albacore: *Thunnus alalunga*) แม้จะมีการบริโภคมาก แต่ก็มีอุบัติการณ์สารพิษฮีสตามีนน้อยกว่าปลา 2 ชนิดแรกดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ปลาทูน่าเป็นปลาที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดฮีสตามีนมากกว่าปลาชนิดอื่น ๆ อาการเกิดพิษจึงถูกเรียกตามชื่อวงศ์ของปลาว่า Scombrid poisoning นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณฮีสทิดีนจะพบในส่วนเนื้อขาวมากกว่าในส่วนเนื้อค้ำของปลาตัวเดียวกัน (Antoine *et al.*, 2001) วงศ์ของปลาที่มีปริมาณฮีสทิดีนรองลงมา ได้แก่ วงศ์ Scomberesocidae เช่น ปลาซอร์รี่ (saury) มีปริมาณฮีสทิดีน 16,100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วงศ์ Clupeidae เช่น ปลาแฮริง ชาร์ดีน และพิวชาร์ด ฯลฯ และวงศ์ Engraulidae ได้แก่ ปลากระดัก (Taylor, 1985)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณฮีสทีดีนในปลาชนิดต่างๆ

ชื่อทางการค้า	วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ฮีสทีดีน (มก./กก.)
Anchovy, European Japanese	Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i>	6,210
		<i>Engraulis japonicas</i>	4,810
Herring, Atlantic	Clupeidae	<i>Clupea harengus</i>	1,230-2,950
Mackerel, Frigate Chub Horse Atlantic	Scombridae	<i>Auxis tapeinocephalus</i>	14,600
		<i>Scomber japonica</i>	1,063-8,020
		<i>Trachurus japonicas</i>	172-3,680
		<i>Scomber scombrus</i>	2,000-4,500
Mahi-Mahi	Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	1,829-9,370
Marlin, Black Striped	Istiophoridae	<i>Makaira mazara</i>	7,630
		<i>Makaira mitsukurii</i>	8,310-13,200
Pilchard or sardine Sardine, European Pilchard, Japanese	Clupeidae	<i>Sardina pilchardus</i>	2,888
		<i>Sardinops sagax</i>	1,227-7,626
Salmon Atlantic Salmon Chinook Salmon	Salmonidae	<i>Salmo salar</i>	130-300
		<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	70-288
Saury	Scomberesocidae	<i>Cololabis saira</i>	16,100
Tuna - Bonito - Skipjack - Longtail tuna - Albacore - Yellowfin	Scombridae	<i>Auxis thazard</i>	4,330-10,100
		<i>Katsuwonus pelamis</i>	13,400-20,000
		<i>Thunnus tonggol</i>	11,540
		<i>Thunnus alalunga</i>	4,600-6,790
		<i>Thunnus albacares</i>	2,123-12,200

ที่มา: ดัดแปลงจาก FAO/WHO (2013)

สำหรับปลาน้ำจืด ฮีสตามีนเกิดขึ้นน้อยกว่าในปลาทะเล เนื่องจากมีฮีสทีดีนอิสระในปลาชนิดนี้น้อย (Ababouch *et al.*, 2014) จึงไม่พบรายงานการเกิดอาหารเป็นพิษจากการบริโภคปลาน้ำจืด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Krizek *et al.* (2011) ที่ศึกษาการสลายไปโอเจนิคเอมีนในปลาน้ำจืดแก่และเนื้อมด (ปลาไน เรนโบว์เทราต์ และเพิร์ช) ที่เก็บรักษาที่ 3 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่าฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในขณะที่การเสื่อมเสียทางกายภาพของปลาเป็นไปอย่างรวดเร็วกว่า

โดยที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนในเนื้อบด อยู่ในช่วงตั้งแต่ไม่พบ จนถึง 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระยะเวลา 17 วัน และในระยะเวลาเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนยังไม่เกินระดับความปลอดภัย (500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ทั้งในปลาแล่และเนื้อบด โดยพบอยู่ในช่วง 33 – 110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3.2 แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลส

ปัจจัยที่สองที่ทำให้เกิดการสร้างฮีสตามีนเพิ่มขึ้นในอาหาร ได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลส โดยทั่วไป แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีน หรือสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสได้นั้น มีทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคทีเรียแกรมลบ วงศ์ Enterobacteriaceae มีบทบาทมากที่สุดในการสร้างฮีสตามีนในปลา และผลิตภัณฑ์จากปลา ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกประเภท แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* (Kung et al., 2007) จะสร้างฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก เช่น น้ำปลา (Ruiz-Capillas and Jimenez-Colmenero, 2010; Kimura et al., 2001)

2.3.2.1 Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสได้นั้น มีหลายชนิด ได้แก่ *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumonia* และ *Enterobacter aerogenes* (Baylis, 2006) อย่างไรก็ตาม กลุ่มแบคทีเรียที่เจริญในอุณหภูมิต่ำ (psychrophile) ก็ยังสามารถสร้างฮีสตามีนได้เช่นกัน แต่ในปริมาณที่น้อยกว่า และใช้เวลามากกว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *M. psychrotolerans* และ *Photobacterium phosphoreum* ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส (Emborg and Dalgaard, 2008a) แบคทีเรียที่สามารถสร้างฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสได้ แสดงในตารางที่ 2.2

แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวปลาไม่สามารถสร้างเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสได้ทุกชนิด อีกทั้งปลาชนิดต่างกัน จะมีแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีนแตกต่างกัน โดย Yoshinaga and Frank (1982) รายงานจำนวนแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในปลาทูน่า Skipjack และแม็กเคอเรลที่เสื่อมเสียไว้ที่ประมาณ 13.4 เพอร์เซ็นต์ ต่อมา Ababouch et al. (1991) แยกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจากปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) ที่เก็บในน้ำแข็งและอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ได้ 55 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 568 สายพันธุ์ และในปี ค.ศ. 1996 Lopez-Sabater et al. ได้รายงานผลการศึกษาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีนในปลา โดยพบว่า แบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีน มีจำนวน 0.1 เพอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในตัวอย่างปลาโอลายและแม็กเคอเรล ในปี ค.ศ. 1999 Ben-Gigirey et al. ได้คัดแยกเชื้อจากทูน่าครีบบาวสดและแช่แข็ง

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮีสทีดีนดีคาร์บอกซิเลสในปลา

กลุ่มแบคทีเรีย	วงศ์	ชนิด
mesophiles	Enterobacteriaceae	<i>Morganella morganii</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>R. ornithinolytica</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i>
	Clostridiaceae	<i>Clostridium perfringens</i>
	Vibionaceae	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Photobacterium damsela</i>
	Bacillales	<i>Bacillus spp.</i>
	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>S. kloosii</i>
	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter lowffi</i>
	Shewanellaceae	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>
	Aromonadaceae	<i>Aeromonas hydrophila</i>
psychrophiles	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i>
	Enterobacteriaceae	<i>Morganella psychrotolerans</i>
	Vibionaceae	<i>Photobacterium phosphoreum</i>

ที่มา: Middlebrooks *et al.* (1988), Shalaby (1996), Baylis (2006), Emborg and Dalgaard (2008b), Nollet and Toldra, eds. (2010)

ได้จำนวน 227 สายพันธุ์ และมีเพียง 10 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้แต่ในปริมาณต่ำ (< 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียชนิดเดียวกันอาจสร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วย (EFSA, 2011) แต่หากไม่มีแบคทีเรียกลุ่มนี้ ก็จะไม่สามารถสร้างฮีสตามีนขึ้นมาได้ โดย Tao *et al.* (2009) ได้ศึกษายืนยันว่าปลาที่ปลอดเชื้อจะไม่มีการสร้างฮีสตามีนแต่อย่างใด โดยวางแผ่นดิสก์ขนาด 6 มิลลิเมตร ที่จุ่มเชื้อ *M. morganii* NBRC 3168 และ *P. phosphoreum* NBRC 13896 บนเนื้อปลา พบว่า เนื้อปลาที่สัมผัสกับเชื้อ จะมีปริมาณฮีสตามีนมากกว่าตำแหน่งที่ไม่สัมผัส เนื้อปลาที่ปลอดเชื้อ ไม่มีการสร้างฮีสตามีน แม้เวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ที่ 20 และ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำทะเล และปนเปื้อนอยู่บนผิวหนัง เหงือก และ ลำไส้ของปลา โดย Kim *et al.* (2001) ศึกษาแหล่งปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนของทูน่าครีบน้ำจืด พบว่า สามารถแยกเชื้อได้จากผิวหนัง และเหงือกของปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ยังสามารถแยกเชื้อได้จากส่วนของกล้ามเนื้อ เมื่อเก็บรักษาปลาในอุณหภูมิที่สูงขึ้นอีก ด้วย ต่อมา Kim *et al.* (2003) ได้ตรวจหา *M. morgani* ในผิวหนัง เหงือก และช่องท้องของปลา โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) พบว่าในเหงือกจะมีเชื้อนี้มากที่สุดเช่นกัน รองลงมาคือที่ผิวหนัง และมีเชื้อนี้น้อยที่สุดในส่วนของช่องท้อง ถึงแม้ว่าการตัดท้องควักไส้ปลา สามารถช่วยลดจำนวนแบคทีเรียได้ แต่ไม่สามารถกำจัดได้หมด และมักพบฮีสตามีนบริเวณเนื้อปลาส่วนหน้า (anterior) มากกว่าส่วนท้าย (posterior) เนื่องจากเป็นส่วนที่อยู่ใกล้เหงือกและช่องท้องที่มีเชื้อแบคทีเรีย เมื่อปลาสัมผัสโดยตรงกับเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮิสทีดิลีนดีคาร์บอกซิเลส เช่น ในระหว่างการฆ่าล้างเนื้อ โดยเฉพาอย่างยิ่งเมื่ออัตราการสัมผัสเชื้อกับพื้นที่ผิวสูง เช่น เนื้อปลาทูน่าบดสำหรับทำสลัด จะทำให้การเกิดฮีสตามีนมีมากขึ้น แม้ว่าเนื้อทูน่านั้นผ่านการแปรรูปเป็นอาหารกระป๋องแล้ว แต่การปนเปื้อนข้าม (cross contamination) เกิดขึ้นได้ระหว่างการเตรียมสลัด ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญและสร้างฮีสตามีนได้ (FDA, 2011)

นอกจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่มาจากในแหล่งธรรมชาติแล้ว มีรายงานพบการปนเปื้อนในขั้นตอนหลังการจับและการแปรรูปในโรงงานที่ทำให้เกิดกระบวนการสร้างฮีสตามีนในปลาได้ โดย Kim *et al.* (2003) สืบตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในโรงงานผลิตทูน่ากระป๋อง ไม่พบเชื้อในบริเวณพื้นผิวสัมผัสในห้องผลิตโรงงาน (เครื่องมือ ภาชนะ สายพาน อ่างน้ำ พื้น และทางระบายน้ำ) แสดงถึงสุขลักษณะที่ดีในโรงงาน แต่พบบนสายพานขนส่งปลาจากเรือมายังโรงงาน และภาชนะพลาสติกใส่ปลาในห้องเก็บ ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนกลับในผลิตภัณฑ์ในระหว่างการผลิต และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และ Lopez-Sabater *et al.* (1994) ศึกษาคุณภาพทางแบคทีเรียและปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างทูน่าในขั้นตอนการผลิตทูน่ากระป๋องของประเทศสเปน โดยพบเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนในขั้นตอนสุดท้ายก่อนการฆ่าเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแกรมลบ วงศ์ Enterobacteriaceae และพบ *M. morgani* มากที่สุด โดยเชื้อส่วนใหญ่ที่พบมักมาจากการปนเปื้อนในระหว่างการจับและการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะก่อนถึงโรงงาน นอกจากนี้ เครื่องมือทำการประมงมีส่วนทำให้เชื้อเจริญเพิ่มขึ้นด้วย เช่น การจับปลาแบบเบ็ดราว ทำให้ปลาตายและอยู่ในน้ำเป็นระยะเวลาอันยาวนานก่อนถูกนำขึ้นเรือและทำให้เย็นลง ซึ่งในระหว่างนั้น อาจมีการสร้างฮีสตามีนในปลาแล้ว โดยเฉพาะ ปลาที่จับในน้ำจืดหรือน้ำเค็ม (Lawley *et al.*, 2012)

2.3.2.2 *Morganella morgani*

M. morgani เป็นแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae แกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของคน โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ และพบได้ในน้ำและดิน เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศหรืออากาศน้อย (facultative anaerobe) *M. morgani* เคยถูกจำแนกเป็น

Proteus morganii และต่อมาได้จำแนกใหม่ให้อยู่ในสกุล *Morganella* เป็นเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ และไม่ย่อยแล็กโตส (non-lactose fermenting) (Liu *et al.*, 2016)

แบคทีเรียในสกุล *Morganella* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างฮีสตามีนในปลา โดยเฉพาะ *M. morganii* ดังเช่น Nahla and Farag (2005) จำแนกแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนจากตัวอย่างปลาที่องคิ่นและนำเข้าของประเทศอียิปต์ พบว่ามี *M. morganii* และรองลงมา เป็นเชื้อชนิดอื่น การศึกษาของ Behling and Taylor (1982) ที่ศึกษาการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ 6 ชนิดในอุณหภูมิต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของทูน่า (tuna infusion broth) รายงานว่า อัตราการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ *M. morganii* 110SC2 สร้างฮีสตามีนปริมาณมากที่สุด เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้อยกว่า 24 ชั่วโมง ส่วน *M. morganii* JM สร้างฮีสตามีนมากที่สุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Frank *et al.* (1985) ที่ได้จำแนกแบคทีเรียในปลาโอได้มอญ (Mahimahi: *Coryphaena hippurus*) บ่มในน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน และ 32 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อที่จำแนกได้เป็นแกรมลบทั้งหมด โดยพบ *V. alginolyticus* มากที่สุด รองลงมาคือ *M. morganii* และเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่จำแนกได้ใน Tryptic soy broth ที่มีฮีสทิดีน 2% และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *M. morganii* เป็นเชื้อที่สร้างฮีสตามีนได้ดีที่สุด

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Lopez-Sabater *et al.* ได้จำแนกเชื้อที่สร้างฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลสในปลาโอลาย (bonito) และแม็กเคอเรล ที่จำหน่ายในตลาดค้าปลีกในบาซิลอนา ประเทศสเปน พบว่า *M. morganii* เป็นเชื้อที่สร้างฮีสตามีนได้สูงสุด เมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่น ๆ โดยสร้าง 2,765 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kim *et al.* (2000) ที่แยกเชื้อที่สร้างฮีสตามีนจากทูน่าครีบบาว (albacore) บ่มไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า ทูน่าที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณฮีสตามีนมากที่สุด และเชื้อที่จำแนกได้ คือ *M. morganii* เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของทูน่า (tuna infusion broth) พบว่า สร้างฮีสตามีนได้สูงสุด 5,253 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในปีถัดมา Kim *et al.* (2001) ได้จำแนกเชื้อกลุ่ม Enteric ที่สร้างฮีสตามีนจากทูน่าครีบบาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า *M. morganii* สร้างฮีสตามีนได้ดีที่สุด โดยสร้างได้มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Histamine enumeration (HE) ซึ่งประกอบด้วย 0.5% tryptone, 0.5% NaCl, 0.25% K₂HPO₄ และ 1% histidine-HCl โดยมีพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.7

นอกจากนี้ Economou *et al.* (2007) สามารถจำแนกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีนได้หลายชนิด จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนและแบคทีเรียในทูน่าที่ผ่านการทำให้ล่าช้า (delay) ที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ หลายวัน โดยเก็บรักษาทูน่าที่อุณหภูมิเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0 - 2, 3 - 4 และ 6 - 7 องศาเซลเซียส และนำปลาออกมาไว้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ข้างต้นอีก ทำเช่นนี้เป็นเวลา 7 - 12 วัน ผลจากการทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของเชื้อที่จำแนกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฮีสทิดีน 1% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบว่า *M. morgani* สร้างฮีสตามีนได้มากที่สุด 24,499 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการค้นคว้ารายงานการศึกษาต่าง ๆ ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ทำให้สรุปได้ว่า *M. morgani* เป็นเชื้อที่สามารถสร้างฮีสตามีนได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่น ๆ

2.3.2.3 การเจริญของแบคทีเรียและการสร้างฮีสตามีน

การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส แบ่งได้เป็น 2 ระยะ กล่าวคือ ระยะแรกหรือ lag phase เป็นระยะที่ฮีสตามีนเกิดขึ้นน้อยมากหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่แบคทีเรียปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมและเพิ่มจำนวน ซึ่งระยะเวลาในช่วงนี้ขึ้นกับสถานะต่าง ๆ เช่น ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่มีอยู่ในสัตว์น้ำ อัตราการเจริญของเชื้อ และอุณหภูมิ ระยะที่สองหรือ log phase เป็นระยะที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วด้วย ซึ่งแบคทีเรียต้องเจริญจนถึงปริมาณ 10^7 CFU/g หรือมากกว่า จึงจะทำให้ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ไม่ปลอดภัย (Dalgaard *et al.*, 2006) ทั้งนี้ อัตราการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในระยะที่สองนี้ มาจากอิทธิพลของปฏิกิริยาจากเชื้อที่มีปริมาณสูง สถานะการเก็บรักษาสัตว์น้ำ และคุณลักษณะของสัตว์น้ำ (Ababouch *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการศึกษาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีนมานานแล้ว แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับปริมาณฮีสตามีนที่สร้างได้ กล่าวคือ ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การสร้างฮีสตามีนให้ได้ในปริมาณหนึ่งนั้น ต้องมีจำนวนเชื้อเท่าไร (Yoshinaga and Frank, 1982)

Frank *et al.* (1981) ตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในทูน่าห้องแล็บสดที่บ่มที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ รายงานว่าฮีสตามีนจะเริ่มสร้างเมื่อเชื้อเจริญผ่านช่วง lag phase ไปแล้ว ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลา 6-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37.8 องศาเซลเซียส โดยฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อมา Behling and Taylor (1982) ศึกษาการสร้างฮีสตามีนในสารละลายทูน่า (tuna infusion broth) โดยเติมแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนและบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ รายงานว่าช่วงระยะเวลาที่เอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลสทำปฏิกิริยาสูงสุดคือช่วงปลายของ log phase เนื่องจากพบปริมาณในช่วงนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับ Lopez-Sabater *et al.* (1995) ที่ศึกษาการสร้างฮีสตามีนของ *M. morgani* ที่เติมในทูน่า (*Thunnus thynnus*) พบว่า ฮีสตามีนจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นจาก 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ log phase แล้ว โดยใช้เวลา 15 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส

.....

นอกจากนี้ Kim *et al.* (2002) ศึกษาการสร้างฮีสตามีนของ *M. morgani* โดยเติมเชื้อนี้ในเนื้อปลาจนได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/g และบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ แล้วตรวจปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาตามระยะเวลาที่กำหนด พบว่าฮีสตามีนจะสร้างสูงสุดเมื่อ *M. morgani* เจริญจนถึงระยะ stationary phase แล้ว เช่นเดียวกับ การศึกษาการสร้างฮีสตามีนในเกี่ยวทูน่าของ Lee *et al.* (2012) โดยการเติมเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ในเนื้อทูน่า พบว่าฮีสตามีนจะถูกสร้างสูงสุดเมื่อผ่านช่วงปลาย log phase แล้ว และการศึกษาของสุวิมลและวาริพัทธ์ (2559) ที่ฮีสตามีนเริ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ log phase แล้วเช่นกัน ทั้งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลา 6-9 ชั่วโมง การศึกษาของ Kim *et al.* (2002) โดยเติมเชื้อ *M. morgani* 10^6 CFU ต่อกรัม ในเนื้อทูน่าที่รีบยาวบดแสดงให้เห็นว่าเชื้อจะใช้เวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียสในการเข้าสู่ stationary phase โดยมีเชื้อในระดับ 10^9 CFU ต่อกรัม และฮีสตามีนมีปริมาณสูงสุดหลังจากเข้าสู่ระยะนี้ โดยฮีสตามีนจะสร้างได้คี่ที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม Kim *et al.* (2000) รายงานว่าระยะการเจริญของเชื้อ (Growth phase) และอุณหภูมิเหมาะสมในการสร้างฮีสตามีน จะแปรเปลี่ยนไปตามชนิดและปริมาณเชื้อในสัตว์น้ำ

การศึกษาของสุวิมลและวาริพัทธ์ (2559) รายงานความสัมพันธ์ของการสร้างฮีสตามีนและการเจริญของเชื้อทั้งหมดเป็นแบบ non-growth association สอดคล้องกับการทดลองของ Lopez-Sabater *et al.* (1995) ซึ่งเติมเชื้อ *M. morgani* จำนวน 10^7 CFU ต่อกรัมในเนื้อปลาทูน่าชิ้นเล็กแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเริ่มเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อบ่มไปแล้วเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่ฮีสตามีนเริ่มเพิ่มปริมาณขึ้นเมื่อบ่มไปแล้ว 12 ชั่วโมง สาเหตุเนื่องมาจากกระบวนการสร้างฮีสตามีนเกิดจากเอนไซม์ฮิสทีดอินดีคาร์บอกซีเลสไปทำปฏิกิริยากับฮิสทีดอินอิสระ เมื่อปริมาณเอนไซม์มีมากกว่าที่เชื้อมีปริมาณมาก การสร้างฮีสตามีนก็จะมีความคืบ (Jay, 2005)

2.3.3 สถานะเหมาะสมต่อการเจริญ

เนื่องจากฮีสตามีน เกิดจากกระบวนการดีคาร์บอกซีเลชันของแบคทีเรีย ดังนั้น อุณหภูมิการเก็บรักษาปลาจึงเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง ที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีน โดย Hu *et al.* (2012) ศึกษาการสร้างฮีสตามีนในปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 25 องศาเซลเซียส ปลาสร้างฮีสตามีนมากกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และไม่พบการสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิแช่แข็ง องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) จึงแนะนำให้เก็บรักษาปลาสดไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส อยู่เสมอ เพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีน หรือหากปลาที่เก็บอยู่ในอุณหภูมิห้อง หรือ สิ่งแวดล้อม ที่สูงกว่า 21 องศาเซลเซียส ควรทำการผลิตให้เสร็จสิ้นภายใน 12 ชั่วโมง (FDA, 2011)

การศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการสร้างฮีสตามีน เช่น Guizani *et al.* (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการสร้างฮีสตามีนในทูน่าครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) พบว่า ปลาที่เก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานถึง 17 วัน โดยฮีสตามีนไม่สูงกว่ามาตรฐานกำหนด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ปลาที่เก็บที่ 8 และ 20 องศาเซลเซียส จะเริ่มไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค และฮีสตามีนสูงกว่ามาตรฐานกำหนด เมื่อเก็บรักษาปลามากกว่า 4 และ 1 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Shakila *et al.* (2003) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนในปลาที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง 32 ± 2 องศาเซลเซียส ผลการศึกษารายงานว่า ปลาแม็กเคอเรลมีฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจนอยู่ในระดับที่มากกว่ามาตรฐานกำหนด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง และซาร์ดีนภายใน 15 ชั่วโมง ส่วน Economou *et al.* (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนและแบคทีเรียในทูน่าสดและแช่แข็ง โดยนำปลามาวางไว้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส วันละ 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 - 2 และ 6 - 7 องศาเซลเซียส พบว่าปลาที่วางให้ล่าช้า (delay) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วันละ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 6 - 7 องศาเซลเซียส จะมีฮีสตามีนสูงสุด โดยเพิ่มขึ้นจาก 26.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น 430, 769 และ 1,962 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระยะเวลาการเก็บ 4, 8, 12 วัน ตามลำดับ

นอกจากนี้ Kim *et al.* (2002) ศึกษาการสร้างฮีสตามีน โดย *M. morgani* ที่อุณหภูมิ 4, 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในปลาแม็กเคอเรล ทูน่าครีบยาว อีโต้มอญ และแซลมอน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25 องศาเซลเซียส โดยปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปลาที่เก็บรักษา 6 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเป็น 4,610 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในแม็กเคอเรล 3,430 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทูน่าครีบยาว และ 3,340 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในปลาอีโต้มอญ ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การสร้างฮีสตามีนเป็นไปอย่างช้า ๆ และ Du *et al.* (2002) พบว่าอุณหภูมิน้ำแข็งสามารถชะลอการสร้างฮีสตามีนได้ โดยทูน่าที่เก็บรักษาที่ 0 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเพียง 18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 9 วัน ในขณะที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนเพิ่มเป็น 832 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายใน 3 วัน เช่นเดียวกับ Middlebrooks *et al.* (1988) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเจริญของแบคทีเรียและการสร้างเอมีนในปลาอินทรีที่เก็บรักษาที่ 0, 15 และ 30 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่อีกสองอุณหภูมิ ปริมาณฮีสตามีนเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า

ส่วน Wei *et al.* (1990) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและการสร้างฮีสตามีนในทูน่าที่บรรจุแบบสุญญากาศ พบว่า ไม่มีผลต่อการสร้างฮีสตามีน ในขณะที่การเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิต่ำ จะช่วยชะลอการสร้างฮีสตามีนได้

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างไบโอเจนิคเอมีน โดยแบคทีเรียอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) อยู่ที่ระหว่าง 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส และการสร้างจะลดลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 องศาเซลเซียส หรือที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (EFSA, 2011) Behling and Taylor (1982) ศึกษาการสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อโดย *M. morgani* ที่อุณหภูมิ 15, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างฮีสตามีนสูงสุดแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดสำหรับสายพันธุ์ 110SC2 และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับ สายพันธุ์ JM และการศึกษาของสุวิมลและวิพัทธ์ (2559) พบว่าเชื้อ *M. morgani* สายพันธุ์ DMST1564 จะสร้างฮีสตามีนได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ในขณะที่เดียวกัน อุณหภูมิต่ำสุดที่แบคทีเรียสามารถสร้างฮีสตามีนได้ ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย โดย *H. alvei*, *C. freundii* และ *E. coli* จะสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *M. morgani* ที่ 15 องศาเซลเซียส (Behling and Taylor, 1982)

การเปลี่ยนแปลงของฮีสตามีนในปลาหมึกที่อุณหภูมิการเก็บรักษาต่าง ๆ โดยการเติมเชื้อ *Raoultella ornithinolytica* ในพู่กันกระป๋องของ Lin *et al.* (2012) พบว่า ตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 2 log CFU ต่อกรัม ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วถึงระดับมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่าง 5 log CFU ต่อกรัม ฮีสตามีนจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสูงกว่า อย่างไรก็ตาม ฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหากเก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งเชื้อที่ log 2 และ 5 ในขณะที่ Lee *et al.* (2012) ได้ศึกษาการสร้างฮีสตามีนโดยเติมเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ในกล้วยน้ำและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าฮีสตามีนจะเพิ่มมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างที่มีเชื้อตั้งต้น 2 log CFU ต่อกรัม และที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในตัวอย่าง 5 log CFU ต่อกรัม แต่การเจริญของแบคทีเรียจะถูกระงับในทุกตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ ระยะเวลาที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนเช่นกัน Shakila *et al.* (2005) ศึกษาผลของระยะเวลาล่าช้าในกระบวนการผลิตพู่กัน skipjack (*Katsuwonus pelamis*) บรรจุกระป๋องต่อการสร้างฮีสตามีน ตั้งแต่หลังการจับจนถึงกระบวนการผลิตในโรงงาน พบว่า การเก็บปลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังจากจับ ทำให้ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับ นิสานาดและคณะ (2551) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาหมึกในระหว่างการผลิตพู่กันกระป๋อง พบว่าปลาหมึกแช่แข็งที่มีฮีสตามีนเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.3 - 9.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อทดลองวางขึ้นเนื้อปลาที่นึ่งสุกและขูดสะอาดแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6, 10 และ 15 ชั่วโมง ก่อนบรรจุกระป๋อง ปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาเพิ่มขึ้นเป็น 9.5, 13.0 และ 14.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วน Lopez-Sabater *et al.* (1995) ได้ศึกษาคูณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลาหมึก (*Thunnus thynnus*) พบว่า ปริมาณฮีสตามีนในปลาที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0, 8 และ 20 องศาเซลเซียส ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศสหรัฐอเมริกา คือ น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แม้ว่าลักษณะทางประสาทสัมผัสจะอยู่ในระดับที่ไม่ยอมรับแล้ว

Staruszkiewicz *et al.* (2004) ศึกษาผลของการดูแลรักษา (handling) ปลาโอใต้ มอญ ทูน่าท้องแถบ และทูน่าครีบลีโอง ในเรือและท่าเรือ ต่อการเพิ่มขึ้นของไบโอเจนิคเอมีน โดยเก็บปลาในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิ 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าปลาทูน่าท้องแถบสร้างฮีสตามีนเร็วกว่าทูน่าครีบลีโอง ทั้งนี้ เนื่องจากทูน่าท้องแถบมีฮีสทิดีนในกล้ามเนื้อมากกว่าทูน่าครีบลีโอง

2.3.4 การเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน

การเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน โดยเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส คือการปล่อยกลุ่มแอลฟา คาร์บอกซิล ออกจากโครงสร้างของฮีสทิดีน ทำให้ฮีสทิดีนเปลี่ยนเป็นฮีสตามีน โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงฮีสทิดีนนี้แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามชนิดของเอนไซม์ คือ เอนไซม์ที่ใช้ pyridoxal 5'-phosphate และ เอนไซม์ที่ใช้ pyruvoyl โดยเอนไซม์ประเภทแรกพบในแบคทีเรียแกรมลบ (*M. morgani*, *R. planticola*, *E. aerogene*, *Photobacterium phosphoreum* และ *P. damsela*) ส่วนเอนไซม์ประเภทที่ 2 พบในแบคทีเรียแกรมบวก (*Lactobacillus* 30a, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc oeni*, *Clostridium perfringens*) กลไกการสร้างฮีสตามีนของประเภทที่ใช้ pyridoxal phosphate (pyridoxal phosphate dependent reaction) เริ่มจากเมื่อเอนไซม์จับกับฮีสทิดีน (กรดอะมิโน) จะมีพันธะ pyridoxylidene amino acid ระหว่างกลุ่มอะมิโนของกรดอะมิโน และกลุ่มอัลดีไฮด์ของ pyridoxal-5'-phosphate ของเอนไซม์ กลุ่มคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนถูกปล่อยออกมาพร้อมคาร์บอนไดออกไซด์ และ pyridoxylidene amino acid จะแยกออกเป็น pyridoxal phosphate และเอมีน โดยการเพิ่มโมเลกุลน้ำ ส่วนปฏิกิริยาประเภทที่สองที่ไม่ใช่ pyridoxal phosphate (non-pyridoxal phosphate dependent reaction) ก็เช่นเดียวกัน โดย pyruvoyl residue ทำปฏิกิริยาแทน pyridoxal phosphate (Eitenmiller and Souza, 1984; Ababouch *et al.*, 2014) ในแบคทีเรียที่มีชีวิต เอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลสจะทำงานร่วมกับตัวแลกเปลี่ยนเมมเบรน (membrane exchanger) โดยให้ฮีสทิดีนผ่านเข้าไปในเซลล์ทางเยื่อหุ้มเซลล์นี้ และในขณะเดียวกันก็ให้ฮีสตามีนที่ผลิตออกมาขนถ่ายออกจากเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มนี้เช่นกัน (Ababouch *et al.*, 2014)

เอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส จึงมีบทบาทสำคัญในการเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน เปลี่ยนฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ มีรูปร่างค่อนข้างซับซ้อน (อรัญ, 2555) และมีขนาดใหญ่กว่าสารตั้งต้นเสมอ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับสารตั้งต้น (สมศักดิ์, 2550) เช่น เอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลส จำเพาะกับการย่อยกรดอะมิโนฮีสทิดีน เปลี่ยนไปเป็นฮีสตามีน และเอนไซม์ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส จำเพาะกับการย่อยไลซีน เป็นคาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์วาริน (Ruiz-Capillas and Jimenez-Colmenero, 2010) เป็นต้น การทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ เป็นการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยตัวเอนไซม์จะไม่เปลี่ยนแปลง สามารถกลับมาเป็นอิสระใหม่ตลอดเวลาและทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้อีก ดังนั้น ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อทำปฏิกิริยาสมบูรณ์ จึงมีจำนวนน้อย เมื่อเทียบกับจำนวนของสารตั้งต้น (สมศักดิ์, 2550) เนื่องจากเอนไซม์เป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิหรือความเป็นกรด่างไม่เหมาะสม การทำงานของเอนไซม์จะผิดปกติ (อรรณู, 2555) เอนไซม์บางชนิดต้องทำงานภายใต้อุณหภูมิหรือความร้อนที่จุดหนึ่ง ต้องมีความเป็นกรด่างที่เหมาะสม จึงจะทำให้เอนไซม์นั้นทำปฏิกิริยาได้ (สมศักดิ์, 2550)

Eitenmiller and Souza (1984) กล่าวว่าเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสจะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด อุณหภูมิน้อยกว่า 30 องศาเซลเซียส และเกิดได้ดีในช่วงเวลาที่การแบ่งตัวของแบคทีเรียสิ้นสุดแล้ว จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซีเลชันของ Eitenmiller *et al.* (1981) โดยศึกษาในช่วงพีเอช 5 – 8.5 พบว่า ที่พีเอช 5 ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นดีที่สุด และ 8.5 จะเกิดน้อยสุด อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาร่วมกับอุณหภูมิ พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาดีที่สุด อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.5 ซึ่งปลาที่ตายแล้วจะมีพีเอชมากกว่า 6.0 (Gram and Huss, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับ Behling and Taylor (1982) ที่กล่าวว่า ฮีสตามีนจะเกิดขึ้นได้ดีที่สภาวะพีเอชต่ำ แต่หากสัตว์น้ำนั้นถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิตู้เย็น ก็จะเกิดขึ้นมากได้เช่นกัน Kanki *et al.* (2007) สรุปผลการศึกษาการสร้างฮีสตามีนของเอนไซม์ฮีสทิดีน ดีคาร์บอกซีเลส ที่สกัดได้จากเชื้อต่าง ๆ พบว่า เชื้อแต่ละชนิดสร้างฮีสตามีนได้ดีที่สุดที่พีเอชไม่เหมือนกัน โดย *M. morgani* สายพันธุ์ JCM 1672 สร้างได้ดีที่พีเอช 6.5 และสร้างปานกลางที่ 5.5 และ 8.5

นอกจากนี้ Eitenmiller *et al.* (1981) ยังศึกษาการสร้างเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลส และการสร้างฮีสตามีนในเนื้อปลาทูน่าแช่ที่จุ่มเชื้อ *M. morgani* สายพันธุ์ GRMO6 จำนวน 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการสร้างเอนไซม์และฮีสตามีนอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 24 และ 30 องศาเซลเซียส โดยฮีสตามีนอยู่ในระดับ 325 และ 528 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และเอนไซม์จะถูกสร้างน้อยมากที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ต่อมา Jay *et al.* (2005) รายงานว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่เหมาะสมต่อการสร้างฮีสตามีนโดย *M. morgani* คือ 15 องศาเซลเซียส ส่วน Torres *et al.* (2002) รายงานผลการทดลองการสร้างฮีสตามีนในอาหารสังเคราะห์ของ *M. morgani* ที่แยกได้จากปลาแม็กเคอเรล (*Trachurus murphyi*) ว่า ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนถูกสร้างได้ดีกว่าที่ 15 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีนขึ้นอยู่กับ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลส โดยอุณหภูมิมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลส ทั้งช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น หรือ ทำให้อัตราการทำงานของเอนไซม์ลดลง หรือ

ทำลายเอนไซม์ในที่สุด ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างฮีสตามีน (Olley and Baranowski, 1985) Kanki *et al.* (2007) ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดจาก *P. phosphoreum*, *Photobacterium damsela*, *R. planticola* และ *M. morganii* ในเนื้อปลาที่ผ่านการให้ความร้อน เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาที่ทำให้สุกแล้วไม่ได้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด และความเย็นในระดับแช่แข็งสามารถชะลอปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ ผู้วิจัยได้เติมเอนไซม์ในบัพเฟอร์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน แต่ไม่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์ตลอดช่วงระยะเวลาดังกล่าว เช่นเดียวกับ Kim *et al.* (2002) ที่ศึกษาการสร้างฮีสตามีน โดยการเติม *M. morganii* ในปลาชนิดต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ -30 ถึง 37 องศาเซลเซียส พบว่า ตัวอย่างปลาที่อุณหภูมิแช่แข็งตรวจไม่พบฮีสตามีน แต่เมื่อนำปลาแช่แข็งนั้นมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

2.4 การเก็บรักษาและอุณหภูมิ

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า กระบวนการสร้างฮีสตามีนจะเกิดขึ้น เมื่อปลาถูกเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ฮีสตามีนเกิดขึ้นจาก bacterial metabolites โดยทั่วไป จึงเกิดจากผลของการเน่าเสียของสัตว์น้ำที่อุณหภูมิสูงมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ และสัมพันธ์กับการเสื่อมเสียทางกายภาพด้วย (FDA, 2011) เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ตลอดเวลาในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งหากมีการจัดการที่ไม่เหมาะสม ตั้งแต่การจับในเรือประมง การขนส่ง การแปรรูป การจำหน่าย และการเตรียมอาหารในครัวเรือน อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเอื้ออำนวยให้แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ชนิดนี้สำหรับเอนไซม์ฮีสทีดีนดีคาร์บอกซิเลสเมื่อถูกสร้างขึ้นมาแล้ว ก็จะทำงานอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าแบคทีเรียนั้นได้ถูกทำลายไปแล้ว การยับยั้งจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ สามารถทำได้โดยการแช่แข็ง และการใช้ความร้อนระดับการต้มสุก (Kung *et al.*, 2007) ดังนั้น การดูแลรักษาปลาให้อยู่ในอุณหภูมิต่ำอยู่เสมอจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะรักษาปริมาณฮีสตามีนในปลาให้อยู่ในระดับต่ำและปลอดภัยต่อการบริโภค อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีนบางชนิดเป็นแบคทีเรียทั่วไปพบได้ในปลาที่มีชีวิต แต่ส่วนใหญ่น่าจะมาจากการปนเปื้อนหลังการจับ ตั้งแต่ในเรือประมง โรงงานผลิต และในระหว่างการขนส่ง (Lopez-Sabater *et al.*, 1996) ดังนั้น ปัจจัยหลักที่จะทำให้ปริมาณแบคทีเรียและฮีสตามีนอยู่ในระดับต่ำได้ จะต้องเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็วทันทีหลังการจับและรักษาอุณหภูมิให้ต่ำอยู่เสมอตลอดการขนส่งและการผลิต

Kim *et al.* (1999) ศึกษาการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในทูน่าครีบน้ำตม ตั้งแต่หลังการจับจนถึงกระบวนการแปรรูปในโรงงาน โดยเก็บรักษาปลาที่ 0 - 37 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างฮีสตามีน คือ 25 องศาเซลเซียส และไม่พบฮีสตามีนในปลาที่เก็บในน้ำแข็ง

ตลอด 18 วัน นอกจากนี้ ปลาทั้งตัวจะให้ฮีสตามีนสูงกว่าปลาที่ตัดแต่งแล้ว และยังพบว่า ในระหว่างการแปรรูปทูน่า หากมีการควบคุมอุณหภูมิและเวลาที่ไม่เหมาะสม ฮีสตามีนจะเพิ่มปริมาณขึ้นได้อีก

Krizek *et al.* (2011) ศึกษาการสร้างไบโอเจนิคเอมีนในปลาน้ำจืด โดยเปรียบเทียบระหว่างปลาแล่และเนื้อปลาสด เก็บที่ 3 และ 15 องศาเซลเซียส ปลาที่ใช้ ได้แก่ เรนโบว์เทราต์ ปลาไน และปลาเพิร์ช ซึ่งเป็นปลาที่มีกรดไม่อิ่มตัวสูง ผู้วิจัยสรุปว่า ที่อุณหภูมิต่ำ ปลาสดสร้างฮีสตามีนสูงกว่าปลาแล่ แต่ที่อุณหภูมิสูง การสร้างฮีสตามีนมีปริมาณใกล้เคียงกัน ไม่ว่าจะเป็ปลาแบบแล่หรืออบ

สำหรับการศึกษาฮีสตามีนในทูน่าที่ผลิตในโรงงาน ชันยาภรณ์ และคณะ (2549) ศึกษาคุณภาพและความปลอดภัยของฮีสตามีนในทูน่าห้องแถบ (skipjack) นำเข้าซึ่งอยู่ในรูปแช่เยือกแข็งตลอดระยะเวลา 11 เดือน พบว่า ปริมาณฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0 – 3.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลิตภัณฑ์กระป๋องจะอยู่ในช่วง 3.21 – 12.09 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากปริมาณฮีสตามีนเริ่มต้นในวัตถุดิบอยู่ในระดับต่ำ รวมถึงการควบคุมระยะเวลาการผลิตตามข้อกำหนดของกรมประมง จึงทำให้ฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

ชญาณิน และวงศ์ทิพา (2559) ตรวจสอบปริมาณฮีสตามีนในวัตถุดิบทูน่าลอยน้ำแช่แข็งที่นำเข้ามาเพื่อผลิตทูน่ากระป๋อง 136 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมีสารดังกล่าวระหว่าง 3.4 – 38.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำเนื้อทูน่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนบรรจุกระป๋อง ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากปริมาณฮีสตามีนตั้งต้นยังอยู่ในระดับต่ำ แต่เนื้อปลาที่ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จะไม่เป็นที่ยอมรับทางประสาทสัมผัส

นอกจากนั้น ปริมาณฮีสตามีนจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นจนถึงระดับไม่ปลอดภัยได้ ทั้งที่ปลายังไม่เสื่อมเสียทางกายภาพ ดังนั้น ปลาที่มีลักษณะกายภาพที่ดี สด มีโอกาสที่จะมีฮีสตามีนในปริมาณสูงได้ เช่นเดียวกับปลาที่เสื่อมเสียแล้ว (Jay *et al.*, 2005) การควบคุมป้องกันไม่ให้มีฮีสตามีนเพิ่มขึ้นในปลา จึงมุ่งไปที่การควบคุมแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนไม่ให้เจริญเติบโตจนเพิ่มจำนวนขึ้น เนื่องจากเมื่อฮีสตามีนถูกสร้างขึ้นมาแล้ว จะถูกทำลายยาก (Chong *et al.*, 2011) โดยทั่วไป ปลาสดที่เพิ่งจับจากทะเลจะมีปริมาณฮีสตามีนในระดับต่ำ เนื่องจากเนื้อปลายังอยู่ในสภาวะปลอดภัย (Frank, 1985) Kerr *et al.* (2002) วิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในทูน่าครีบบเหลือง (*Thunnus albacares*) ที่เพิ่งจับจากทะเล พบเพียง 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่านั้น ในขณะที่เมื่อตั้งปลาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 17 องศาเซลเซียส ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่พักปลาไว้ และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากการเก็บ 30 ชั่วโมง สำหรับปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 หรือ 0 องศาเซลเซียส ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตลอดระยะเวลา 6 และ 8 วันตามลำดับ เช่นเดียวกับ Frank *et al.* (1981) ที่ตรวจพบฮีสตามีนในปริมาณเดียวกันในทูน่าห้องแถบ แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้น ฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษา คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศา

เซลเซียส ฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 591 - 3,690 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน Allen *et al.* (2005) ตรวจสอบวิเคราะห์ฮีสตามีนที่จับจากเรือประมง 1 วัน พบว่า ปริมาณฮีสตามีนน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ Oliveira *et al.* (2012) ศึกษาผลของการดูแลรักษาทูน่าสดในเรือเบ็ดราวที่ทำการประมงในเขตน่านน้ำประเทศบราซิล โดยนำปลาที่เอาเลือดออกและผ่าท้องควักไส้แล้ว เก็บรักษาในน้ำแข็งเกล็ด เป็นเวลา 25 - 32 วัน ก่อนกลับเข้าฝั่ง พบว่า ปริมาณฮีสตามีนยังอยู่ในระดับต่ำที่ 4.92 – 6.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การดูแลรักษาปลาในเรือประมงหลังจับ ในระหว่างการขนส่งและการผลิตในโรงงาน จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลา

2.5 อุบัติการณ์การเกิดพิษฮีสตามีน

อาหาร (ปลา) เป็นพิษจากฮีสตามีน (Histamine fish poisoning) เกิดจากการรับพิษเข้าร่างกาย (Intoxication) จากการบริโภคปลาที่มีฮีสตามีนสูง โดยเฉพาะปลาทะเลหลายชนิด ยกเว้นปลาน้ำจืด และสัตว์น้ำเปลือกแข็ง เช่น กุ้งและหอย (Ababouch *et al.*, 2014) ปริมาณฮีสตามีนในปลาที่ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการเจ็บป่วยได้ คือ ตั้งแต่ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมขึ้นไป แต่ส่วนใหญ่ มักพบอาการเมื่อรับฮีสตามีนมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศสหรัฐอเมริกาจึงได้กำหนดระดับความปลอดภัย (safety level) ของฮีสตามีนไว้ที่ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกำหนดระดับที่ต้องดำเนินการ (action level) หรือระดับที่ปฏิเสธสินค้า (reject) ที่ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FDA, 2011) แม้ว่าการเกิดอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีนจะเป็นอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปในประเทศต่าง ๆ แต่การรายงานการเกิดอุบัติการณ์นี้มักมีน้อย หรือไม่ได้รับการรายงาน (under-reported) เนื่องจาก (Ababouch *et al.*, 2014; Lehane and Olley, 2000)

- หลายประเทศไม่ได้เก็บข้อมูลอุบัติการณ์การเกิดอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีน
- อาการเจ็บป่วยจากพิษฮีสตามีนไม่รุนแรงและแสดงอาการในระยะเวลาสั้น ผู้ป่วยจึงไม่ได้เข้ารับการรักษาที่สถานพยาบาล
- อาการของโรคอาจได้รับการวินิจฉัยและรายงานไม่ถูกต้อง เนื่องจากมีอาการคล้ายอาหารเป็นพิษชนิดอื่น เช่น แซลโมเนลโลซิส และการแพ้อาหารอื่น ๆ รวมทั้งอาการที่แสดงออกของพิษฮีสตามีนยังหลากหลาย ขึ้นกับความต้านทานของแต่ละบุคคล
- ในกรณีของอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีน อาจเกิดในผู้ป่วยเพียง 1 ราย ต่อ 1 อุบัติการณ์ แต่การรวบรวมสถิติการเจ็บป่วย ได้รวมจำนวนผู้ป่วยจากหลาย ๆ ครั้ง เป็น 1 อุบัติการณ์ จึงทำให้มีสถิติการเกิดน้อย

สหราชอาณาจักรรายงานว่าในระหว่างปี พ.ศ. 2535 ถึง 2547 มีอุบัติการณ์การเกิดอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีนทั้งหมด 56 ครั้ง (เฉลี่ย 0 - 10 ครั้งต่อปี) โดยมีผู้ป่วย 296 ราย และการเกิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเป็นพิษมีแนวโน้มจะเกิดขึ้นมากในช่วงระหว่างฤดูร้อน นอกจากนี้ ในช่วงระหว่างเดือน ธันวาคม 2547 ถึง สิงหาคม 2548 มีเหตุการณ์เกิดขึ้น 24 ครั้ง โดยมีผู้ป่วย 46 ราย และ 3 รายต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล จากการสืบหาสาเหตุของ Health Protection Agency ของสหราชอาณาจักร พบว่า บางอุบัติการณ์สาเหตุมาจากวิธีการเตรียมแซนวิชทูน่าไม่เหมาะสมในสถานประกอบการอาหาร ทำให้เกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียและเจริญเติบโตจนเพิ่มปริมาณฮีสตามีน ในปริมาณมากกว่า 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (McLauchlin *et al.*, 2005)

ในปี พ.ศ. 2544 ประเทศเดนมาร์กรายงานการเกิดการเจ็บป่วยของเด็ก 13 คน จากการบริโภคปลากระโทงเทงที่มีฮีสตามีน 1,000 – 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Dalgaard *et al.*, 2006) และในปี พ.ศ. 2547 มีรายงานการเจ็บป่วยจากการบริโภคทูน่ารมควันแบบเย็น ตรวจพบฮีสตามีนอยู่ในช่วง 500 - 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Emborg and Dalgaard, 2006) ส่วนประเทศไต้หวัน ในปี 2544 มีรายงานอาหารเป็นพิษเนื่องจากฮีสตามีนในปลาแม็กเคอเรลกระป๋อง ที่มีฮีสตามีน 1,539 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Tsai *et al.*, 2005a) และในปี พ.ศ. 2549 ผู้ป่วย 7 ราย จากการบริโภคเกี่ยวไต้ทูน่า ฮีสตามีน 1,608 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Chen *et al.*, 2008) สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2550 พบการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากฮีสตามีนในทูน่า 446 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผู้ป่วยที่แสดงอาการ 92 ราย (นลินี และคณะ, 2550) ในสหรัฐอเมริกา อาหารทะเลจัดอยู่ในลำดับที่ 3 ของอาหารที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยมีฮีสตามีนเป็นสาเหตุหลักจากการบริโภคปลาโอโต้มอญ ทูน่า แม็กเคอเรล bluefish ชาร์ดีน และ Amberjack (Chong *et al.*, 2011)

แม้ว่าสารพิษฮีสตามีนทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยที่ไม่รุนแรง แต่ก็มีความสำคัญทางด้านความปลอดภัยอาหารและการค้าระหว่างประเทศ สารชนิดนี้มักพบในปลาทะเลที่ขาดการดูแลอุณหภูมิในขั้นตอนการเก็บรักษาและระหว่างการผลิตอย่างเหมาะสม ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวปลา มีโอกาสเจริญเติบโต มีผลทำให้ปลาเกิดการเน่าเสีย และสร้างสารชนิดนี้ขึ้นมา ด้วยสาเหตุดังกล่าว หลายประเทศจึงใช้ปริมาณฮีสตามีนเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาและสุขลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ ปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนและฮีสตามีนอยู่ในระดับต่ำ ต้องทำให้ปลาเย็นลงโดยเร็วที่สุด หลังการจับ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นตลอดทุกขั้นตอนการผลิต รวมทั้งการเก็บในหีบเก็บ (Lehane and Olley, 2000) หลายประเทศกำหนดให้ฮีสตามีนเป็นอันตรายที่ต้องควบคุมในระบบ Hazard Analysis Critical Control Point โดยขั้นตอนการผลิตใดที่วิเคราะห์แล้วว่ามีโอกาสทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีน จำเป็นต้องควบคุมให้เป็นจุดวิกฤต (critical control point) โดยการควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาการผลิตให้เหมาะสม ไม่ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีปริมาณฮีสตามีนเกินมาตรฐานกำหนด บางประเทศเช่น สหรัฐฯ ได้กำหนดให้ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ทูน่าต้องควบคุมอุณหภูมิและเวลาที่กำหนดเฉพาะสำหรับการผลิตทูน่าให้สอดคล้องกับมาตรฐานดังกล่าวด้วย

การนำระบบวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤต (Hazard Analysis Critical Control Point – HACCP) มาใช้จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะให้ความมั่นใจในการควบคุมคุณภาพดังกล่าว Hwang *et al.* (2011) ศึกษาปริมาณไบโอเจนิคเอมีน รวมทั้งฮีสตามีน ในโรงงานที่มีและไม่มีระบบ HACCP ในไต้หวัน โดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนและจำแนกเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีนในตัวอย่างปลา 20 ตัวอย่าง ได้แก่ กุมา กระโทงเทง (*Xiphias gladius*) และกระโทงสีน้ำเงิน (*Makaira nigricans*) และตรวจเชื้ออย่างเดียวนบนพื้นผิวอุปกรณ์ 21 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณฮีสตามีนและเชื้อของตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานที่มีระบบ HACCP จะน้อยกว่าโรงงานที่ไม่มีระบบ HACCP แต่เนื่องจากโรงงานทั้งหมดที่ศึกษาได้เก็บรักษาปลาในน้ำแข็งเป็นอย่างดี ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทั้งหมดจากโรงงานสองประเภทนี้ จึงพบน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามข้อกำหนดของสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตาม การปฏิบัติและการจัดการสัตว์น้ำอย่างถูกสุขลักษณะก็เป็นสิ่งสำคัญเพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษฮีสตามีนไปยังสัตว์น้ำ ซึ่ง Taylor (1985) กล่าวว่า การปนเปื้อนหลังการจับสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาตั้งแต่บนเรือประมง ในโรงงานแปรรูป และระหว่างการขนส่ง

ความเสี่ยงต่อการเกิดพิษเนื่องจากฮีสตามีน ขึ้นกับปริมาณปลาที่บริโภคและระดับฮีสตามีนในอาหารด้วย Guillier *et al.* (2011) ได้จัดลำดับความเสี่ยงดังกล่าวด้วยการใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Risk Ranger ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความเสี่ยงเชิงกึ่งปริมาณ (semiquantitative risk analysis) และประมาณจำนวนอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้นต่อปี โดยจัดลำดับกลุ่มอาหารที่มีความเสี่ยงจากมากไปหาน้อย 6 กลุ่ม ได้แก่ ปลาสด ปลาแปรรูปแช่เย็น ปลาแปรรูปขึ้นสูงแช่เย็น แซลมอนสด ปลากระป๋อง และปลาสดแช่แข็ง

2.6 มาตรฐานฮีสตามีนของประเทศต่างๆ

2.6.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์

แม้ว่าปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดถึงปริมาณฮีสตามีนที่จะทำให้เกิดการเจ็บป่วย แต่หลายประเทศใช้ค่าฮีสตามีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาและสุขลักษณะในการผลิต โดยกำหนดค่าฮีสตามีนเป็นมาตรฐานในการตรวจผ่านผลิตภัณฑ์ดังกล่าว รวมไปถึงผลิตภัณฑ์นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งหากถูกตรวจพบฮีสตามีนเกินมาตรฐาน ก็จะถูกปฏิเสธการนำเข้าทันที ยกตัวอย่างเช่น USFDA (United State Food and Drug Administration) ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนด defect action level ที่ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งตั้งบนพื้นฐานที่ว่า ปลาสดจะมีฮีสตามีนน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้น ฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นจึงมาจากการดูแลรักษาปลาที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และในความหมายของ FDA ปลาที่มีฮีสตามีน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นปลาที่เสื่อมเสียแล้ว และไม่เหมาะต่อการบริโภค แม้การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพยังไม่เน่าเสียอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชัดเจน (FDA, online) ในขณะที่ CFIA (Canadian Food Inspection Agency) ประเทศแคนาดา กำหนดที่ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป กำหนดแผนการสุ่มตัวอย่างของ สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณฮีสทามีนอิสระสูงเป็น 9 ตัวอย่าง ($n = 9$) โดยตรวจพบฮีสตามีนใน ระหว่าง 100 (m) ถึง 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (M) ไม่มากกว่า 2 ตัวอย่าง ($c = 2$) มาตรฐานฮีสตามีนของประเทศต่าง ๆ มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 มาตรฐานฮีสตามีนในสินค้าประมง

ประเทศที่กำหนด มาตรฐาน	ชนิดสินค้า	ค่ามาตรฐาน (มก./กก.)
ออสเตรเลีย และ นิวซีแลนด์	ปลาทูน่า แม็กเคอเรล ซาร์ดีนและปลาในตระกูล <i>Clupeidae, Scrombridae, Scrombresocidae, Pomatomidae and Coryphaenedae</i>	200
จีน	ปลาทูน่า แม็กเคอเรลซาร์ดีนและปลาในตระกูล <i>Scrombridae</i>	100
	ปลาอินทรีเค็ม	100
แคนาดา	ผลิตภัณฑ์จากปลากลุ่มสคอมบอยด์ เช่น ทูน่า แม็กเคอเรล มาฮิม่าฮิ)	100
	ปลากะตัก น้ำปลา	200
สหรัฐอเมริกา	ทูน่า Mahi Mahi และปลาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง	50
สหภาพยุโรป	ปลาทูน่า แม็กเคอเรลซาร์ดีนและปลาในตระกูล <i>Clupeidae, Scrombridae, Scrombresocidae, Pomatomidae and Coryphaenedae</i>	$n = 9, c = 2$ $m = 100$ $M = 200$

หมายเหตุ: n หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ

c หมายถึง จำนวนตัวอย่างสูงสุดที่ยอมให้พบเชื้อในปริมาณระหว่าง m และ M

m หมายถึง ปริมาณของเชื้อสูงสุดสำหรับตัวอย่างที่คุณภาพดี

M หมายถึงปริมาณของเชื้อสูงสุดที่ยอมรับได้

ที่มา: ดัดแปลงจาก กรมประมง (2558)

2.6.2 มาตรฐานการผลิต

เนื่องจากการสุ่มตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนของแต่ละรุ่นผลิตภัณฑ์ ไม่สามารถ ดำเนินการได้ร้อยละ 100 หรือให้หลักประกันในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทั้งรุ่นได้ ประเทศต่าง ๆ จึง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้กำหนดมาตรฐานการผลิตผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเพิ่มขึ้นของฮิสตามีนควบคู่กันไปด้วย โดยสหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนด EC 853/2004 ให้ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำสด (Fresh fishery products) และผลิตภัณฑ์ที่ไม่แปรรูปและละลายแล้ว (Thawed unprocessed fishery products) ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่น้ำแข็งละลาย (melting ice) ซึ่งหลายประเทศได้กำหนดไว้ที่ 0 – 2 องศาเซลเซียส ส่วนผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปอย่างง่าย (Lightly preserved) มีเกลือน้อยกว่าร้อยละ 6 และค่าพีเอช มากกว่า 5 เช่น ผลิตภัณฑ์รมควัน ผลิตภัณฑ์มาริเนท (marinated) ต้องเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือน้อยกว่า

สำหรับมาตรฐานของสหรัฐอเมริกา (FDA, 2011) ได้จัดทำรายละเอียดข้อแนะนำต่าง ๆ ในระหว่างการจับและดูแลรักษาปลาในเรือ (ตารางที่ 2.4) โดยเน้นการควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาปลาตั้งแต่เริ่มจับขึ้นมายบนเรือ ด้วยการแช่เย็น (chilling) ปลาทันทีหลังจากปลาตาย เพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮิสตามีน โดยเฉพาะปลาที่มาจากน้ำในประเทศเขตร้อน และพู่กันซึ่งเป็นปลาที่สามารถผลิตความร้อน (generate heat) ในเนื้อเยื่อของตัวเอง

ตารางที่ 2.4 ระยะเวลาที่ควรแช่เย็นปลาที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4.4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการสร้างฮิสตามีน ในปลาที่มาจากน้ำและอากาศอุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิน้ำทะเล (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	ระยะเวลาที่ต้องแช่เย็น ปลาในเรือทันทีหลังจาก ตาย (ชั่วโมง)	ระยะเวลาที่ต้องแช่เย็น ปลาบนบกหลังจากตาย (ชั่วโมง)
สำหรับปลาทั้งตัวที่ยังไม่ผ่าท้องควักไส้			
> 18.3	> 28.3	6	-
> 28.3	Any*	6	-
> 18.3 แต่ ≤ 28.3	≤ 28.3	9	-
≤ 18.3	> 28.3	-	6
≤ 18.3	≤ 28.3	-	9
สำหรับปลาที่ผ่าท้องควักไส้แล้วบนเรือ			
> 18.3	Any*	12	-
≤ 18.3	Any*	-	12

หมายเหตุ * หมายถึง อุณหภูมิอากาศเท่าไรก็ได้ ไม่ได้นำมาพิจารณา

ที่มา: FDA (2011)

ในช่วงหลังการจับในเรือประมงจนถึงโรงงาน สหรัฐอเมริกาแนะนำให้ปลาทั้งตัวที่ยังไม่ผ่าท้องควักไส้ที่มาจากน้ำทะเล หรือสัมผัสกับอากาศที่มีอุณหภูมิมากกว่า 28.3 องศาเซลเซียส สหรัฐอเมริกาแนะนำให้เก็บรักษาปลาทันทีในน้ำแข็ง น้ำทะเลเย็น น้ำแข็งบดผสมน้ำ (ice slurry)

หรือ น้ำเกลือ (brine) ที่อุณหภูมิ 4.4 องศาเซลเซียส หรือน้อยกว่า หรือภายในระยะเวลาไม่นานกว่า 6 ชั่วโมงหลังจากปลาตาย ในขณะที่ ปลาที่มาจากอุณหภูมิน้ำน้อยกว่า 18.3 แต่ไม่เกิน 28.3 องศาเซลเซียส และอยู่ในอุณหภูมิอากาศไม่เกิน 28.3 องศาเซลเซียส สามารถนำไปแช่เย็นภายใน 9 ชั่วโมง ทั้งนี้ เพื่อป้องกันความเสี่ยงของการสร้างฮิสตามีนเพิ่มขึ้น

การควบคุมอุณหภูมิและเวลาของปลาสดในเรือจับ จะช่วยป้องกันการสร้างเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซีเลสในปลาได้ตั้งแต่ต้น ซึ่งหากมีการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาแล้ว จะไม่สามารถควบคุมการสร้างฮิสตามีนได้ สำหรับการควบคุมระยะเวลาผลิตในโรงงาน สหรัฐฯ กำหนดให้ปลาที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว (เช่น วัตถุดิบปลาทูน่าแช่แข็ง ที่โรงงานในประเทศไทยนำมาผลิตเป็นปลาทูน่ากระป๋อง) หากอยู่ในอุณหภูมิมากกว่า 21.1 องศาเซลเซียส ต้องใช้ระยะเวลาการผลิตไม่มากกว่า 12 ชั่วโมง นับตั้งแต่เริ่มนำปลาออกมาจากห้องเย็น (Cold storage) ผ่านการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ จนถึงขั้นตอนที่ไม่ปนเปื้อนเชื้ออีก (กรณีปลาทูน่ากระป๋องคือ ขั้นตอนการฆ่าเชื้อของปลากระป๋อง) แต่หากปลาอยู่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 21.1 องศาเซลเซียส สามารถใช้เวลาผลิตได้ 24 ชั่วโมง โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ระยะเวลาสูงสุด (ชั่วโมง) ที่ปลาจะอยู่ได้โดยไม่เพิ่มฮิสตามีน

อุณหภูมิห้องที่ปลาสัมผัส (°C)	ปลาสดที่ยังไม่ผ่านการทำให้สุกหรือแช่แข็งมาก่อน	ปลาสดที่ผ่านการแช่แข็งหรือให้ความร้อนมาก่อน
> 21.1 (ช่วงใดช่วงหนึ่งของการผลิต)	≤ 4	≤ 12
≤ 21.1 (ตลอดช่วงการผลิต)	≤ 8	≤ 24

ที่มา: FDA (2011)

ในส่วนของกรมประมง ได้จัดทำข้อกำหนดสุขลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาทูน่า (กรมประมง, 2552) ทั้งปลา ทูน่ากระป๋อง ขวดแก้ว ถูงเพาช์ และทูน่าลอยด์แช่แข็ง เพื่อควบคุมการสร้างฮิสตามีนในระหว่างการผลิต โดยมีรายละเอียดครอบคลุมการปฏิบัติและการควบคุมที่จำเป็นในขั้นตอนการผลิตตั้งแต่การรับวัตถุดิบปลา การดูแลและเก็บรักษาปลา การละลาย การผ่าท้อง/เรียงปลา การจัดเรียงลงตะแกรงนึ่ง การนึ่ง และการชุบสะอาดขึ้นปลา ระยะเวลาในการผลิตผลิตภัณฑ์ทูน่า โดยกำหนดอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตแต่ละขั้นตอน เช่น อุณหภูมิปลาที่ละลายแล้วต้องไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส เวลาตั้งแต่สิ้นสุดการละลายปลาจนถึงผ่าท้องปลาเสร็จสิ้นไม่เกิน 2 ชั่วโมง สำหรับปลาขนาดเล็กกว่า 5 กิโลกรัม และ 4 ชั่วโมง สำหรับปลาที่ใหญ่กว่า 5 กิโลกรัม เป็นต้น

2.7 วิธีการตรวจวิเคราะห์ฮีสตามีน

การตรวจวิเคราะห์ฮีสตามีนในปลาสามารถดำเนินการได้หลายวิธี เนื่องจากมาตรฐานฮีสตามีนที่กำหนดมีระดับค่อนข้างสูง จึงทำให้สามารถใช้วิธีการตรวจได้อย่างหลากหลาย ตั้งแต่วิธีการที่มีต้นทุนไม่สูง เช่น โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) จนถึงวิธีการที่มีต้นทุนและประสิทธิภาพสูง อย่างเช่น ลิกวิดโครมาโตกราฟี (Liquid chromatography mass spectrophotometer, LC-MS) ที่ใช้หลักการแยกสารที่ต้องการด้วย Liquid chromatograph แล้วจึงตรวจวัดด้วย mass spectrophotometer (Hungerford, 2010)

การแยกสารฮีสตามีนในปลาส่วนใหญ่ใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC) โดยตรวจวัดฮีสตามีนด้วยการทำให้สารฮีสตามีนเรืองแสงในขั้นตอนก่อนหรือหลังผ่านคอลัมน์ แล้ววัดสารโดยตรงด้วยแสง UV จับกับวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole ring) ของฮีสตามีน วิธีการอื่น ๆ อย่างเช่นวิธีไอออนโครมาโตกราฟี (Ion Chromatography) Capillary electrophoresis, paper electrophoresis และ gas chromatography เป็นที่นิยมใช้เช่นกัน สำหรับวิธี Liquid chromatography mass spectrometry สามารถตรวจวัดฮีสตามีนไปพร้อมกับสารไบโอเจนิคเอมีนตัวอื่น ๆ โดยใช้หลักการของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นของเหลว ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการนำพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ไปสู่เครื่องตรวจวัด (detector) UV/Vis spectrophotometry หรือเครื่องตรวจวัดทางคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าโดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสงในช่วงรังสียูวีและช่วงวิซิเบิล (Hungerford, 2010)

อีกวิธีการหนึ่งที่ได้รับการรับรองจาก Association of Official Analytical Chemists, AOAC แล้ว และเป็นวิธีการที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ วิธีฟลูออโรเมตริก (Fluorometric method) หลักการคือ นำตัวอย่างปลาสกัดฮีสตามีนด้วยเมธานอล กรองสารสกัดที่ได้และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange column) แล้วทำให้เกิดอนุพันธ์ฮีสตามีนกับสารออร์โธพทาลไดอัลดีไฮด์ (ortho-phthaldialdehyde, OPT) โดยกลุ่มอัลดีไฮด์ 2 กลุ่มฟอร์มตัวเป็นวงใหม่กับกลุ่มเอมีนของฮีสตามีน เป็นสารเรืองแสงละลายน้ำ แล้วจึงวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่องฟลูออโรสเปกโตรมิเตอร์ จากนั้นนำมาคำนวณปริมาณฮีสตามีนกับกราฟฮีสตามีนมาตรฐาน (บั้งอร์และศรชัย, ออนไลน์)

นอกจากนี้ ยังมีวิธีการตรวจแบบง่ายที่นิยมใช้ในภาคสนาม โดยใช้ชุดทดสอบแบบเร็ว ซึ่งใช้หลักการ enzyme immunoassay ที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองเบื้องต้นได้ เช่น วิธี Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ซึ่งสามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณ (Qualitative) และกึ่งปริมาณ (Semi-qualitative) ได้ ซึ่งบางวิธีได้รับการรับรองจาก AOAC แล้ว (Hungerford, 2010)

2.8 สมการทำนายทางคณิตศาสตร์

แบบจำลองหรือสมการทำนายทางคณิตศาสตร์ คือ การศึกษาผลของปัจจัย (ตัวแปรอิสระ) ต่อการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ (ตัวแปรตาม) หนึ่ง ๆ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคาดคะเนการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่ศึกษาได้ ในวงการอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำแบบจำลองมาใช้อย่างแพร่หลาย เริ่มจากการทำนายอายุการเก็บรักษาของอาหาร (prediction of shelflife) โดยศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเน่าเสียของอาหาร หรือต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสีย ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น ต่อมา ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแบบจำลองของการเจริญ (growth model) ของแบคทีเรียมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ใช้ในเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร เช่น การหมัก เพื่อนำแบบจำลองการเจริญของเชื้อไปควบคุมกระบวนการหมัก และใช้ในการควบคุมความปลอดภัยอาหาร โดยศึกษาผลของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์และสภาวะการเก็บรักษาต่อการเจริญและการเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย แบบจำลองการเจริญของเชื้อสามารถใช้ในการประมาณค่าของ kinetic parameter เช่น lag time, อัตราการเจริญสูงสุด (maximum specific growth rate: μ_{max}) และปริมาณสูงสุดของเซลล์แบคทีเรีย (N_{max}) เพื่อใช้ในการทำนายระยะเวลาที่ประชากรแบคทีเรียใช้ในการเพิ่มจำนวนจนถึงปริมาณ (N_t) ที่อาจทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร (Dalgaard, 2002)

การทำนายอายุการเก็บรักษาอาหาร นอกจากต้องใช้แบบจำลองการเจริญของเชื้อแล้ว ต้องมีข้อมูลลักษณะการเจริญของเชื้อ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และมาตรฐานเชื้อที่ทำให้เน่าเสีย ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อที่ระดับ 10^7 CFU ต่อกรัม ก็สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์แสดงการเน่าเสียทางประสาทสัมผัสได้ และใช้เป็นมาตรฐานการเน่าเสีย (Dalgaard, 2002)

ในการจัดทำแบบจำลองเพื่อการทำนายการเจริญของเชื้อในสภาวะต่าง ๆ ปัจจุบันมี 2 ขั้นตอน คือ (Fletcher, 2011)

1. แบบจำลองปฐมภูมิ (primary model) เป็นการแสดงผลของเวลาต่อคุณสมบัติหนึ่ง ๆ ที่กำลังศึกษา (เช่น จำนวนเชื้อแบคทีเรีย) ภายใต้สภาวะการเก็บหรือกระบวนการผลิตที่คงที่ (เช่น การเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส)
2. แบบจำลองทุติยภูมิ (secondary model) เป็นการแสดงผลของ สภาวะการเก็บหรือกระบวนการผลิตที่คงที่หนึ่ง ๆ (เช่น อุณหภูมิการเก็บระหว่าง -5 ถึง 20 องศาเซลเซียส) ต่อการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลองแรก เช่น อัตราการเจริญของเชื้อ

แบบจำลองปฐมภูมิ (primary model) (Dalgaard, 2002)

แบบจำลองการเจริญ (growth model) ที่ได้ ทำให้ได้ค่าของพารามิเตอร์ เช่น lag time (t_{lag}), อัตราการเจริญสูงสุด (μ_{max}) และปริมาณสูงสุดของเซลล์แบคทีเรีย (N_{max}) ด้วย ซึ่งสามารถ

ทำนายเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (N_t) ที่ถึงระดับ absolute rate of metabolite formation (dM/dt) ที่ส่งผลทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ระยะพัก (lag time) เป็นเวลาที่เชื้อชะลอการเจริญในระยะ log ซึ่งระยะพักไม่ใช่คุณลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิด แต่ขึ้นกับสภาพเงื่อนไขทางสรีรวิทยาของเซลล์ และสารตั้งต้น ส่วนอัตราการเจริญสูงสุด (μ_{max}) เป็นอัตราการเจริญของเชื้อปริมาณสูงสุดที่จะเพิ่มได้ ซึ่ง μ_{max} เกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการแบ่งตัว (generation time) คือ $t_g = [\ln 2] / \mu_{max}$

ได้มีการนำแบบจำลองการเจริญของเชื้อแบบ exponential มาใช้เป็นระยะเวลามากกว่า 20 ปีแล้ว โดยมีสมการดัง (2.1)

$$\frac{dN}{dt} = N \times \mu_{max}; N_t = N_0 \times \exp(\mu_{max} \times t) \quad (2.1)$$

อย่างไรก็ตาม เพื่อให้มีความแม่นยำในการทำนายมากขึ้น ได้มีการแปลงสมการ (2.1) โดยเพิ่ม log ทั้งสองข้าง เป็นดังสมการ (2.2)

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0 \times \exp(\mu_{max} \times t)) \quad (2.2)$$

จากสมการดังกล่าว สามารถคำนวณหาอัตราการเจริญ (growth rate) ได้ ดังสมการ (2.3)

$$\mu_{max} = \frac{(\text{log}(N_{t_2}) - \text{Log}(N_{t_1})) \times \text{Ln}(10)}{t_2 - t_1} \quad (2.3)$$

ต่อมา ได้มีการขยายสมการ โดยเพิ่ม lag time (t_{lag}) เข้าไป ดังสมการ (2.4)

$$N_t = N_0 \text{ ถ้า } t < t_{lag}; N_t = N_0 \times \exp(\mu_{max} (t - t_{lag})) \text{ ถ้า } t > t_{lag} \quad (2.4)$$

การเจริญแบบ exponential เป็นการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในสถานะที่ไม่มีปัจจัยจำกัด คือสามารถเพิ่มปริมาณได้สูงขึ้นเรื่อย ๆ ไม่มีสิ้นสุด แต่การเจริญของแบคทีเรียโดยทั่วไปจะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในช่วง log phase และจะคงที่ในระยะหลังจากนั้นคือ stationary phase เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียได้เพิ่มจำนวนสูงสุดจนถึงระดับที่สิ่งแวดล้อมสามารถรองรับได้ (carrying capacity) การเจริญภายใต้สภาวะที่มีปัจจัยจำกัดนี้ เรียกว่า logistic growth ซึ่งการเจริญของเชื้อจะช้าลงเมื่อจำนวนเชื้อ (N) เข้าใกล้ N_{max} กราฟการเจริญจะเป็นแบบ sigmoidal growth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

curve หรือรูปตัว S ในขณะที่กราฟการเจริญของ exponential จะเป็นแบบรูปตัว J สมการ logistic model สำหรับการเจริญของเชื้อ ดังแสดงในสมการ (2.5) และ (2.6)

$$\frac{dN}{dt} = N \times \mu_{max} \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \quad (2.5)$$

$$N_t = N_{max} / (1 + ((N_{max}/N_0) - 1) \times \exp(-\mu_{max} \times t)) \quad (2.6)$$

แบบจำลองทุติยภูมิ (secondary model) (Dalgaard, 2002)

ค่า μ_{max} , lag time และจำนวนเชื้อสูงสุดที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย โดยทั่วไปจะขึ้นกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ บรรยากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ ค่าปริมาณน้ำอิสระและเกลือ ค่าพีเอช แล็กเตท สารกันการเน่าเสีย และรณควัน ดังนั้น แบบจำลองทุติยภูมิจึงใช้อธิบายปัจจัยของสิ่งแวดล้อมต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าเหล่านี้ การแบ่งแบบจำลองปฐมภูมิและทุติยภูมิออกจากกัน จึงใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่มีแนวโน้มที่จะแนะนำให้ใช้เพียงขั้นตอนเดียวมีมากขึ้น อย่างไรก็ตาม แบบจำลองทุติยภูมิเหมาะสมสำหรับการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ซึ่งอาจไม่จำเป็นสำหรับการทำนายอายุการเก็บรักษา หากขอบเขตการเน่าเสีย (spoilage domain) ของเชื้อที่ทำให้เกิดการเน่าเสียครอบคลุมน้อยกว่าในแบบจำลองที่จัดทำ

แบบจำลองที่ใช้ในขั้นตอนนี้ เช่น แบบพหุนามอย่างง่าย (simple polynomial model) ที่ Dalgaard *et al.* (2007) ศึกษาผลของอุณหภูมิ และคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของ *Photobacterium phosphoreum* เพื่อใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาของปลาสดที่เก็บในภาชนะบรรจุจะปรับบรรยากาศ (modified atmosphere packaging) โดยได้สมการ ดัง (2.7)

$$\sqrt{\mu_{max}} = 0.29 + 0.032 \times T - 1.16 \times 10^{-3} \times \%CO_2 - 9 \times 10^{-5} \times T \times \%CO_2 + 9 \times 10^{-6} \times (\%CO_2)^2 \quad (2.7)$$

การนำแบบจำลองทางจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในการทำนายการสร้างเมตาโบไลต์ ร่วมกับการศึกษาการเจริญของเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ฮีสตามีนต้องใช้เวลา และห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือวิเคราะห์ที่เหมาะสม รวมทั้งบุคลากรที่ต้องผ่านการฝึกอบรม ปัจจุบัน จึงมีการจัดทำแบบทำนาย (Predictive model) การสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อใช้คาดการณ์ปริมาณฮีสตามีนที่เกิดขึ้นในอุณหภูมิต่าง ๆ (Frank, 1985) แบบจำลองแรกของการสร้างฮีสตามีนศึกษาโดย Frank *et al.* (1983) ด้วยการวิเคราะห์ฮีสตามีนในทูน่าสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ระดับระหว่าง 70 และ 100 องศาฟาเรนไฮต์ (หรือ 21.1 และ 37.7 องศาเซลเซียส) ในระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟสเกล log-log จะได้เป็นกราฟเส้นตรงทุกอุณหภูมิ โดยให้แกนตั้ง (X) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา และแกนนอน (Y) เป็นปริมาณฮีสตามีน ซึ่งความสัมพันธ์นี้อธิบายได้ด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ (2.8)

$$H = a \cdot T^x \cdot F^y \quad (2.8)$$

โดย H คือ ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัม/100 กรัม) T คือ เวลา (ชั่วโมง) และ F คือ อุณหภูมิ (องศาฟาเรนไฮต์) จากการศึกษานี้ จะได้สมการดังแสดงใน (2.9)

$$H = 2.8 \cdot 10^{-32} \cdot T^{4.86} \cdot F^{13.85} \quad (2.9)$$

Frank and Yoshinaga (1987) ได้ศึกษาแบบจำลองการสร้างฮีสตามีนเช่นกัน โดยทดลองที่อุณหภูมิค่า (-1, 4.4 และ 10 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้ในการคาดคะเนระยะเวลาล่าช้าบนเรือ ที่พู่नाห้องแถบจะอยู่ได้ โดยที่ปริมาณฮีสตามีนไม่เกินมาตรฐานที่กำหนด ก่อนนำไปแช่แข็ง เช่น ที่อุณหภูมิ -1, 4.4 และ 10 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการเพิ่มฮีสตามีน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระยะเวลา 52, 28 และ 12 วัน ตามลำดับ โดยใช้สมการ (2.10)

ต่อมาได้มีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีน โดย Emborg and Dalgaard (2008a) ที่ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิ (0 - 20 องศาเซลเซียส) คาร์บอนไดออกไซด์ (0 - 100 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0.0 - 6.0 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช (5.4 - 6.5) ต่อการเจริญของ *M. psychrotolerans* และการสร้างฮีสตามีนในเนื้อปลาที่ผ่านการสเตอร์ไรซ์ และใน Luria Bertani broth แล้วนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ การเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีน ซึ่งแบบจำลองนี้สามารถอธิบายได้ว่าความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น สภาวะการเก็บรักษา และลักษณะของผลิตภัณฑ์ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีน และแบบจำลองการเจริญของเชื้อใช้สมการโลจิสติก โดยเพิ่มค่า m เพื่อให้สมการถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากเมื่อค่า N ยิ่งเข้าใกล้ N_{max} การเจริญจะยิ่งช้าลง ค่า m จึงเป็นค่าหน่วงการเจริญ (the degree of growth dampening) ดังแสดงใน (2.10)

$$\frac{dN}{dt} = N \times \mu_{max} \left(1 - \left[\frac{N}{N_{max}} \right]^m \right) \quad (2.10)$$

สำหรับสมการโลจิสติกทำนายอัตราการเปลี่ยนแปลงและการสร้างฮีสตามีนในระหว่างการเก็บรักษา ดังแสดงใน (2.11) และ (2.12)

$$\frac{dHis}{dt} = Y_{His/CFU} \cdot \frac{dN}{dt} \cdot 1000 \quad (2.11)$$

$$His_t = His_0 + Y_{His/CFU} \times (N_t - N_0) \quad (2.12)$$

ในขณะที่เดียวกัน Emborg and Dalgaard (2008b) ก็ได้ศึกษาแบบจำลองการเจริญ การยับยั้งด้วยความร้อน และการสร้างฮีสตามีนของเชื้อ *M. psychrotolerans* และ *M. morgani* ในอาหารเหลวและอาหารทะเล โดยศึกษาการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีนที่ระดับอุณหภูมิ ตั้งแต่ 0 ถึง 42.5 องศาเซลเซียส และการยับยั้งการเจริญที่อุณหภูมิ 37.5 ถึง 60 องศาเซลเซียส และใช้สมการโลจิสติกเช่นเดียวกับข้างต้นในการคาดคะเนการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ค่าที่ได้จากการทดลองและการทำนายพบว่าใกล้เคียงกัน

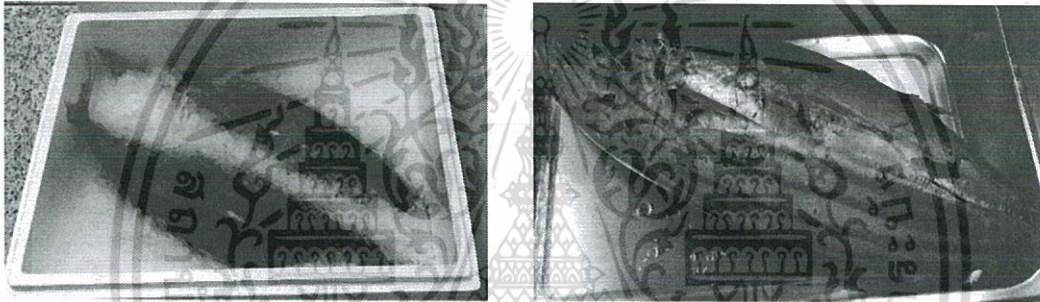


บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุประสงค์

ปลาทูน่าท้องแถบ (skipjack: *Katsuwonus pelamis*) แซ่แข็งซึ่งจับจากมหาสมุทรแปซิฟิก ตะวันตก ขนาดตัวละประมาณ 4 - 7 กิโลกรัม จากโรงงานผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องแห่งหนึ่งใน จังหวัดสมุทรสาคร ปลาที่นำมาทดลองเป็นปลาที่ละลายแล้วในน้ำอุณหภูมิปกติที่โรงงาน เป็น เวลา 4 - 5 ชั่วโมง อุณหภูมิที่กึ่งกลางของปลาทั้งตัวประมาณ -1 ถึง 2 องศาเซลเซียส เก็บในกล่องโฟม ที่มีน้ำแข็ง (ภาพที่ 3.1) เพื่อเก็บรักษาความสดของปลาในระหว่างขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ โดยใช้ ระยะเวลาเดินทางประมาณ 30 นาที ทำการทดลองทันทีเมื่อปลาถึงห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 3.1 ปลาทูน่าท้องแถบ (*Katsuwonus pelamis*) ละลายแล้ว

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้เชื้อ *Morganella morganii* ในการสร้างฮีสตามีน เนื่องจากเป็นเชื้อที่ สร้างฮีสตามีนได้ดี เมื่อเทียบกับเชื้อที่สร้างฮีสตามีนชนิดอื่น ๆ (ดังที่ได้กล่าวในบทที่ 2) โดย *Morganella morganii* DMST 15641 นี้ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่จำแนกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Morganella morganii* ในประเทศไทย

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.3.1 Trypticase soy agar (OXOID, ประเทศสหราชอาณาจักร)
- 3.3.2 Nutrient agar (Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.3 Brain heart infusion broth (Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.4 Trypticase soy broth (Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.5 Butterfield's phosphate-buffer dilution water (RCT Labscan, ประเทศไทย)
- 3.3.6 Standard Plate Count Agar (OXOID, ประเทศสหราชอาณาจักร)
- 3.3.7 Nutrient broth (Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.8 ชุดทดสอบ API 20-E (BioMerieux, ประเทศฝรั่งเศส)
- 3.3.9 Histamine dihydrochloride (AR grade, Sigma-aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.10 Hydrochloric acid (AR grade, RCI Labscan, ประเทศไทย)
- 3.3.11 Phosphoric acid (AR grade, RCI Labscan, ประเทศไทย)
- 3.3.12 Sodium hydroxide (AR grade, Scharlau, ประเทศสเปน)
- 3.3.13 Ion exchange resin (Bio rad AG 1-X8 resin, 50-100mesh chloride form) (Bio Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.14 Potassium dihydrogen phosphate (AR grade, Ajax, ประเทศออสเตรเลีย)
- 3.3.15 Methanol (AR grade, RCI Labscan, ประเทศไทย)
- 3.3.16 o-phthalaldehyde (OPT) (AR grade, Scharlau, ประเทศสเปน)
- 3.3.17 Acetone (AR grade, J.T. Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.3.18 Ethanol (AR grade, RCI Labscan, ประเทศไทย)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.4.1 โถปั่น Tefal LA Moulinette รุ่น DPA1 (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.4.2 Fluorometer JASCO รุ่น FP-2020 (ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.4.3 เครื่องผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer) Heidolph รุ่น Silent Crusher M (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.4.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ Heto รุ่น HMT 200 (ประเทศเดนมาร์ก)
- 3.4.5 ตู้บ่มตัวอย่าง LabTech รุ่น LMI-2004R (ประเทศสหราชอาณาจักร)
- 3.4.6 ตู้บ่มเชื้อ Binder รุ่น KB 400 (ประเทศเยอรมันนี)
- 3.4.7 เครื่องตีปั่นตัวอย่าง Seward รุ่น STOMACHER 400 (ประเทศสหราชอาณาจักร)
- 3.4.8 ตู้อบฆ่าเชื้อ Memmert รุ่น UM 600 (ประเทศเยอรมันนี)
- 3.4.9 Laminar air flow Holten รุ่น HBB 2472 (ประเทศเนเธอร์แลนด์)
- 3.4.10 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น FED 720 (ประเทศเยอรมันนี)
- 3.4.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น AC211S (ประเทศเยอรมันนี)
- 3.4.12 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) Systec รุ่น VE-150 (ประเทศเยอรมันนี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.13 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) Sciencific Industries รุ่น G560E (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.4.14 คอลัมน์แก้ว เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 7 มิลลิเมตร ยาว 20 เซนติเมตร
- 3.4.15 บีกเกอร์
- 3.4.16 กระบอกตวง
- 3.4.17 ปิเปต
- 3.4.18 กระดาษกรอง whatman No.1
- 3.4.19 นาฬิกาจับเวลา

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างปลาที่เติมเชื้อ *Morganella morganii* DMST 15641

(1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *M. morganii* DMST 15641 และทดสอบความบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ รวมถึงการทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีน (Lin *et al.*, 2012)

บ่มเชื้อที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในหลอดอาหารเหลว Brain heart infusion broth (BHI) ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Trypticase soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงต่อใน Nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน เพื่อทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20-E โดย API ต้องมีค่ามากกว่า 80 เปอร์เซนต์ จึงจะนำเชื้อมาใช้ในงานวิจัยต่อไป เก็บรักษาเชื้อที่ผ่านการทดสอบโดยเคลือบบนเม็ดลูกปัด (beads) และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

ทดสอบความสามารถในการสร้างฮีสตามีน 600 ไมโครกรัมต่อกรัมของเชื้อ *M. morganii* DMST 15641 เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่นำมาวิจัยนี้สามารถสร้างฮีสตามีนได้ โดยเตรียมสารมาตรฐานฮีสทิดีน ใน Trypticase soy broth (TSB) เข้มข้น 1% จากนั้นนำเชื้อจาก NA มาบ่มใน TSB นี้ที่ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง แล้ววัดฮีสตามีนด้วยวิธีการฟลูออโรเมตริกตามวิธีของ AOAC official method 977.13 (2015)

(2) การเตรียมกล้าเชื้อ *M. morganii* DMST 15641 (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2552)

นำเชื้อที่เก็บรักษาในเม็ดลูกปัดจากข้อ (1) เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง เชื้อที่แยกออกมาเป็นโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว TSB บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24±2 ชั่วโมง แล้วจึงเจือจางเชื้อ ด้วยสารละลาย Butterfield's phosphate-buffer (พีเอช 7.2) จนได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mcfarland หรือค่าเฉลี่ยประมาณ 1.5×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อจนได้สารละลายแขวนลอยเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 10^3 และ 10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร เพื่อใช้ในข้อ (4) ต่อไป

(3) การเตรียมตัวอย่างปลาปลอดเชื้อ

นำปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งจากข้อ 3.1 มาทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแล่หนังปลาออกจากส่วนหลังถึงหาง แล้วตัดชิ้นปลาเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อแดงหรือส่วนหลังและส่วนท้องล่าง ตัดแบ่งเนื้อปลาเป็นชิ้น ๆ ละประมาณ 100 - 200 กรัม จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อปลาด้วยการเทศารละลายผสมของอะซิโตนและเอธานอล อัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บนเนื้อปลาให้ทั่วถึง ทิ้งไว้นาน 30 วินาที แล้วเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนชิ้นปลา จนหมดกลิ่นของอะซิโตนและเอธานอล (Tsai *et al.*, 2005b) จะได้เนื้อปลาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บรวมเนื้อปลาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในถุงสเตอร์ไรซ์ เพื่อรอนำมาปั่นละเอียด ตัดเนื้อปลาอีกด้านด้วยวิธีเดียวกัน นำเนื้อปลาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในโถบด ปั่นจนละเอียด นานประมาณ 30 วินาที แล้วจึงนำเนื้อปลามาทดสอบความปลอดภัยโดยทดสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี 3.5.2 (2)

ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้ตัวอย่างเนื้อปลาบดแทนปลาแล่ เนื่องจากเนื้อปลาบดมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับเชื้อมากกว่าปลาแล่ ทำให้โอกาสการเกิดอีستามีมีมากกว่า อีกทั้ง การคลุกเคล้าเชื้อในเนื้อบดในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทำได้ทั่วถึงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาแล่

(4) การเติมเชื้อในตัวอย่างปลา

นำสารละลายแขวนลอยเชื้อที่เตรียมจากข้อ (2) ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU ต่อ มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในเนื้อปลา 200 กรัม ที่เตรียมจากข้อ (3) แล้วปั่นผสมนาน 1 นาที จะได้ปริมาณเชื้อ *M. organii* เริ่มต้นที่ 10^2 CFU ต่อกรัม (ปลา)

สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้นสูง จะเตรียมตัวอย่างปลาเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้เชื้อความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร เพื่อให้ปลาที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^5 CFU ต่อกรัม (ปลา)

ทดสอบความเข้มข้นของเชื้อในตัวอย่างทั้ง 2 ระดับ โดยตรวจจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี 3.5.2 (2)

3.5.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อปริมาณเชื้อ *M. organii* และปริมาณอีستามีมีในเนื้อปลาทูน่า

กำหนดปัจจัยที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของเชื้อ 2 ระดับ (10^2 และ 10^5 CFU ต่อกรัม) อุณหภูมิ 3 ระดับ และ ระยะเวลา 8 ระดับ รวม 48 สิ่งทดลอง โดยนำเนื้อปลาจากข้อ 3.5.1 (4) แบ่งใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ถุงละ 25 กรัม เกลี่ยเนื้อปลาให้กระจายทั่วกันแล้วพับปากถุง นำไปบ่มที่ตู้

บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 15 ± 1 , 25 ± 1 และ 35 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ตามความเหมาะสมของแต่ละอุณหภูมิ 8 ครั้ง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ดังนี้

(1) ลักษณะทางกายภาพของเนื้อปลาสดด้วยวิธีสังเกตด้วยตาเปล่า คมกลิ่น และสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏ กลิ่น และ สี โดยผู้วิจัยกำหนดเกณฑ์ขึ้นมาเฉพาะสำหรับการศึกษานี้ เพื่อความสะดวกในการแปลผล ดังนี้

- 1 = กลิ่นสดของเนื้อปลา เนื้อเหนียวปกติ สีแดงเข้ม
- 2 = กลิ่นกลางๆ เนื้อเหนียวน้อยลง สีแดงซีด
- 3 = กลิ่นโลหะ เนื้อร่วน สีน้ำตาลซีด มีตะกอนขาวขุ่น
- 4 = กลิ่นเน่าเสีย เนื้อร่วน สีน้ำตาลเขียว มีตะกอนขาวขุ่น มีน้ำซิม

(2) ปริมาณเชื้อ *M. morgani* โดยวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC official method (2000) (ภาคผนวก ก)

ใช้ซ็อนปลอดเชื้อ ตักเนื้อปลาลงในถุง stomacher 10 กรัม แล้วใส่ใน Butterfield's phosphate-buffered dilution 90 มิลลิลิตร ตีผสมด้วยเครื่อง stomacher จากนั้นเจือจางที่ความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า แล้วจึงปิเปตสารแขวนลอยที่ระดับความเจือจางต่างๆ มาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คำนวณปริมาณเชื้อในตัวอย่างจากจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

(3) ปริมาณฮีสตามีนด้วยวิธีการฟลูออโรเมตริก ตามวิธีของ AOAC official method 977.13 (2015) (ภาคผนวก ข)

ชั่งเนื้อปลา 10 กรัม บดผสมกับเมธานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรอง แล้วจึงปิเปตสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เรซิน ใช้น้ำบริสุทธิ์ชะสารละลายตัวอย่างออกจากคอลัมน์เรซิน ปรับปริมาตรสารละลายที่ได้เป็น 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ 5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ o-phthalaldehyde ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้น 350 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง 444 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฮีสตามีนในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของฮีสตามีนในเนื้อปลา โดย

$$\text{ปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลา (ไมโครกรัมต่อกรัม)} = (C \times 1000) / W$$

โดย C = ปริมาณฮีสตามีนในสารละลายตัวอย่างที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.5.3 การสร้างสมการทำนายการเจริญของเชื้อและปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาทูน่า

สำหรับการทำนายปริมาณฮีสตามีน ทำโดยใช้ปัจจัยแยกแต่ละปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Morganella morganii* และระยะเวลา ที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทูน่าดังกล่าว ด้วยการนำปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นในแต่ละระยะเวลา (t) ของแต่ละอุณหภูมิมาวิเคราะห์การถดถอย (regression) ในโปรแกรม SPSS for windows version 16.0 เพื่อสร้างสมการทางคณิตศาสตร์แบบเส้นตรง (linear) และไม่ใช่เส้นตรง (non-linear) ได้แก่ แบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential, e^{at}) และพหุนามกำลังสอง (quadratic, at^2) และกำลังสาม (cubic, at^3) ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นหรือตัวแปรอิสระ (เวลา, t) และตัวแปรตาม (ปริมาณเชื้อ)

การคัดเลือกสมการทำนาย ใช้เกณฑ์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ที่เข้าใกล้ 1.0 มากที่สุด (ตัวแปรต้นมีอิทธิพลต่อตัวแปรตามตาม) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนาย (standard error of estimate: SEE) ค่าที่ต่ำที่สุด ซึ่งหมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปรตามมีน้อย หรือ ปริมาณเชื้อที่ได้จากการทำนาย เมื่อเปรียบเทียบกับค่าจากการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกับเส้นกราฟถดถอยที่ได้จากการทำนาย หรือกล่าวได้ว่า ปริมาณเชื้อที่ทำนายจากสมการมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลอง หรือเข้าใกล้ศูนย์ แสดงถึงความแม่นยำในการทำนาย

สมการทำนายปริมาณฮีสตามีนแบบ 2 ตัวแปร ใช้สมการโลจิสติก (logistic growth model) $His_t = His_0 + Y_{His/CFU} \times (N_t - N_0)$ ของ Dalgaard (2002) โดยค่า yield factor ($Y_{His/CFU}$) หรือผลได้ของฮีสตามีน เท่ากับ $(His_{max} - His_0) / (CFU_{max} - CFU_0)$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การเปลี่ยนแปลงของปลาที่เติมเชื้อ *M.morganii* ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เนื้อที่นำบดผสมเชื้อ *M. morganii* DMST 15641 ปริมาณ 10^2 และ 10^5 CFU ต่อกรัม มีลักษณะเนื้อเหนียว สีแดงเข้ม และมีกลิ่นคาวปลาเล็กน้อย (ระดับ 1) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะปรากฏ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยภายหลังการบ่ม 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สีของเนื้อปลาเปลี่ยนเป็นแดงซีด มีกลิ่นกลาง ๆ (neutral) และเนื้อสัมผัสมีความเหนียวลดลง (ระดับ 2) และเมื่อบ่มต่อไปจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม 12 ชั่วโมง ปลา มีกลิ่นคล้ายโลหะ เนื้อปลามีสีน้ำตาลอ่อน และร่วน ไม่มีความเหนียว รวมทั้งมีตะกอนขุ่นขาวปรากฏ (ระดับ 3) ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อปลายังคงมีลักษณะเช่นเดิม (ระดับ 1) จนถึงชั่วโมงที่ 9 แล้วลักษณะปรากฏจึงเปลี่ยนเป็นระดับ 2 และเปลี่ยนไปอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเวลาการเก็บ (24 ชั่วโมง) ปลาอยู่ในระดับที่ 3-4 ในขณะที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงพบอย่างชัดเจนเมื่อระยะเวลาการเก็บผ่านไปถึง 24 ชั่วโมง และมากขึ้นจนถึงระดับ 3 ที่ระยะเวลา 32 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปลาโดยทั่วไป ที่เริ่มจากกลิ่นกลาง ๆ (neutral) ของเนื้อปลา หลังจากนั้น จะมีการเน่าเสียที่ชัดเจนขึ้น (Gram and Huss, 1996)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลาที่เติมปริมาณเชื้อแตกต่างกัน พบว่า การเพิ่มปริมาณเชื้อ ทำให้ปลาเปลี่ยนแปลงเร็วกว่า ทั้งนี้ เนื่องจากการเสื่อมเสียของปลาเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรียร่วมด้วย การเปลี่ยนแปลงจะชัดเจนขึ้นจนถึงระดับไม่สามารถยอมรับได้ (reject) เมื่อปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจนถึง $10^7 - 10^8$ CFU ต่อกรัม อย่างไรก็ตาม เชื้อบางกลุ่มเมื่อย่อยสลายปลาแล้วไม่ทำให้เกิดกลิ่นผิดปกติ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มเชื้อที่ทำให้ปลาเน่าเสียโดยเฉพาะ เช่น *Pseudomonas sp.*, *Shewanella putrefaciens* และ *Aeromonads* ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกลิ่นและรสชาติของปลาอย่างชัดเจน (Gram and Huss, 1996)

แม้ว่าตัวอย่างเนื้อปลาบดของทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีลักษณะปรากฏเริ่มต้นอยู่ในระดับ 1 เหมือนกัน แต่ระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงไปสู่อีกระดับต่างกัน ในบางชุด ทั้งนี้ เนื่องจากการทดลองแต่ละชุด ไม่สามารถกำหนดให้ปลาจากรุ่นเดียวกันได้ รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บปลาแช่แข็งที่โรงงานของแต่ละรุ่นไม่เท่ากัน จึงมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัส และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระในปลา ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างฮีสตามีน

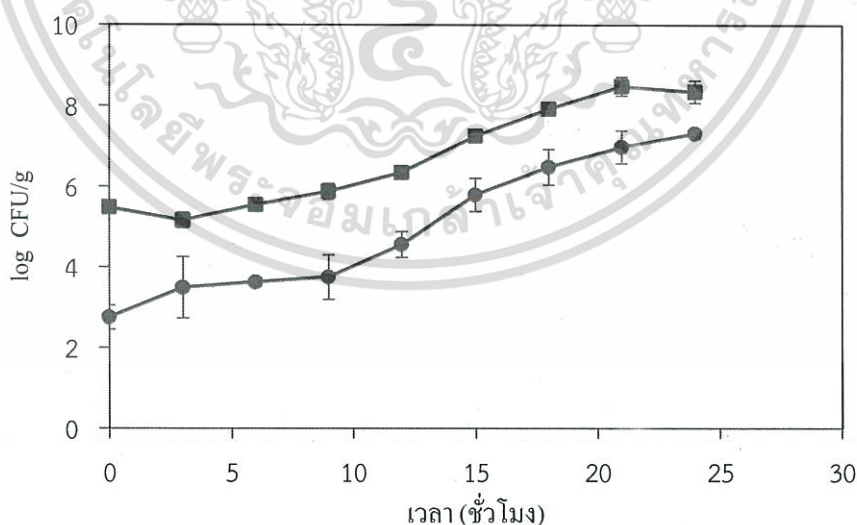
ตารางที่ 4.1 ลักษณะปรากฏของเนื้อมูน้ำบด บ่มที่อุณหภูมิ 35, 25 และ 15 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (°C)	CFU/g	ระดับการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะปรากฏ ตามชั่วโมงต่าง ๆ (3 ชุดการทดลอง)								
		0	12	24	28	32	36	40	44	48
15	10 ²	1*	1,1,2	2*	2*	3,2,2	3,3,2	3,3,2	3,3,2	3*
	10 ⁵	1*	1*	2*	2*	3,3,2	3,3,2	3,3,2	3,3,2	3,3,2
		0	3	6	9	12	15	18	21	24
25	10 ²	1*	1*	1,1,2	1,1,2	2*	2*	2,2,3	2,2,3	3,3,4
	10 ⁵	1*	1*	1,1,2	1,1,2	2*	2*	3,2,4	3,3,4	4,3,4
		0	1.5	3	4.5	6	7.5	9	10.5	12
35	10 ²	1*	1*	1*	1,2,2	1,2,2	2*	2*	2,3,2	3*
	10 ⁵	1*	1*	1*	1,2,2	2*	2*	3,2,2	3,3,2	4,3,3

* หมายถึง ระดับเดียวกันทั้ง 3 ครั้ง

4.2 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญของ *M. morganii* ในปลาทูน้ำห้องแอม

จากการเติม *M. morganii* DMST 15641 ในเนื้อมูน้ำบดให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2 และ 5 log CFU ต่อกรัม แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เชื้อเริ่มต้นทั้ง 2 ความเข้มข้น แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเจริญของ *M. morganii* ในปลาทูน้ำห้องแอมที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2 log

CFU ต่อกรัม (●) และ 5 log CFU ต่อกรัม (■) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส

ลักษณะการเจริญของเชื้อ *M. morgani* เป็นตามรูปแบบการเจริญของเชื้อโดยทั่วไป กล่าวคือ มีระยะ lag phase และ log phase ก่อนเข้าสู่ stationary phase (ภาพที่ 4.1) โดยช่วง lag phase ซึ่งเป็นช่วงการปรับตัวของเชื้อให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมก่อนเพิ่มจำนวนนั้น ตัวอย่างเชื้อ 2 log CFU ต่อกรัม มีระยะ lag phase 9 ชั่วโมง โดยสังเกตจากเชื้อที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จาก 2.75 เป็น 3.75 log CFU ต่อกรัม หลังจากนั้น จึงเข้าสู่ระยะ log phase โดยเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นเส้นตรง จาก 3.75 เป็น 4.56 log CFU ต่อกรัม ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และ 7.31 log CFU ต่อกรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเชื้อดังกล่าวยังไม่ถึง stationary phase ที่ต้องมีจำนวนเชื้อประมาณ $10^8 - 10^9$ CFU ต่อกรัม (Kollanoor-Johny *et al.*, 2012) และเมื่อพิจารณาผลทางกายภาพ พบว่า ตัวอย่างเนื้อหมู่นำบด มีลักษณะทางกายภาพไม่เหมาะสมต่อการบริโภค มีกลิ่นไม่สด เนื้อเริ่มยุ่ย มีสีน้ำตาล-เขียว และมีน้ำซึมออกมาจากเนื้อเยื่อแล้วในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ เชื้ออยู่ในระยะ lag phase นาน อาจเนื่องมาจากเนื้อปลาบดที่เข้าสู่บ่มมีอุณหภูมิน้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส จากการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง จึงทำให้เชื้อมีระยะพักนาน เมื่ออุณหภูมิเนื้อปลาเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิบ่ม เชื้อจึงเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) ที่เดิมเชื้อ *Raoultella ornithinolytica* TS40-2 จำนวน 10^2 CFU ต่อกรัม ในเนื้อหมู่นำกระป๋องบด พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 4.8 log CFU ต่อกรัม ใน 12 ชั่วโมง และเพิ่มเป็น 7.7 log CFU ต่อกรัม ภายใน 24 ชั่วโมง การเจริญของเชื้อนี้เข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อเชื้อมีปริมาณ 8.5 log CFU ต่อกรัม ในเวลา 48 ชั่วโมง แต่ไม่มีระยะ lag phase ในขณะที่การศึกษากการเจริญของ *Enterobacter aerogenes* 1B3-1 ในเนื้อหมู่นำครีบล้างสะอาดผสมกับผักกระหล่ำปลี โดยมีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม ของ Lee *et al.* (2012) มีการเพิ่มจำนวนที่เร็วกว่า โดยพบว่า จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 2 log CFU ต่อกรัม เป็น 6.5 log CFU ต่อกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่มีระยะ lag phase และเข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อเชื้อมีปริมาณ 7 log CFU ต่อกรัม ภายใน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ เชื้อ *R. ornithinolytica* และ *E. aerogenes* เป็นเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางและอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่สามารถผลิตเอนไซม์ ฮีสทิดินดีคาร์บอกซิเลส เช่นเดียวกับ *M. morgani* แต่อาจเนื่องมาจากการบดผสมเนื้อหมู่นำสดกับผักกระหล่ำปลีสด (1:1, w/w) ทำให้เกิดความชื้นมากกว่าเนื้อหมู่นำอย่างเดียว จึงทำให้ *E. aerogenes* เจริญได้อย่างรวดเร็วกว่า

การเจริญของเชื้อในตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม มีรูปแบบเหมือนกับตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 4.1) กล่าวคือ พบการเจริญทั้งในระยะ lag phase ร่วมด้วย โดยระยะ lag phase นี้ พบในระยะเวลา 6 ชั่วโมงแรกของการบ่ม ซึ่งเชื้อมีปริมาณอยู่ระหว่าง 5.47 ถึง 5.87 log CFU ต่อกรัม จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ log phase โดยเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 8.48 log CFU ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม ภายใน 21 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase จนถึงสุดการทดลองที่ 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยังคงมีปริมาณคงที่ 8.35 log CFU ต่อกรัม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) ที่พบว่าเชื้อ *R. ornithinolytica* 5 log CFU ต่อกรัม เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว เป็น 8 log CFU ต่อกรัม ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ในเนื้อหมู่น่ากระป๋องบด โดยไม่มีระยะ lag phase และเข้าสู่ระยะ stationary phase ภายในเวลา 21 ชั่วโมง โดยมีเชื้อปริมาณ 8.5 log CFU ต่อกรัม และการศึกษาของ Lee *et al.* (2012) ที่รายงานว่า ตัวอย่าง *E. aerogenes* 5 log CFU ต่อกรัม เข้าสู่ระยะ lag phase ทันที โดยไม่มีระยะ lag phase และเพิ่มจำนวนจาก 5 เป็น 7.8 log CFU ต่อกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง และสิ้นสุดระยะ lag phase หรือเข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อเชื้อมีปริมาณ 8.5 log CFU ต่อกรัม ในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 48 ชั่วโมง เชื้อมีปริมาณ 8.8 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่ Kim *et al.* (2002) พบว่า *M. morgani* ที่เติมเข้าไปในเนื้อหมู่น่ากระป๋องบด 10^6 CFU ต่อกรัม เข้าสู่ stationary phase ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 4.9×10^9 CFU ต่อกรัม

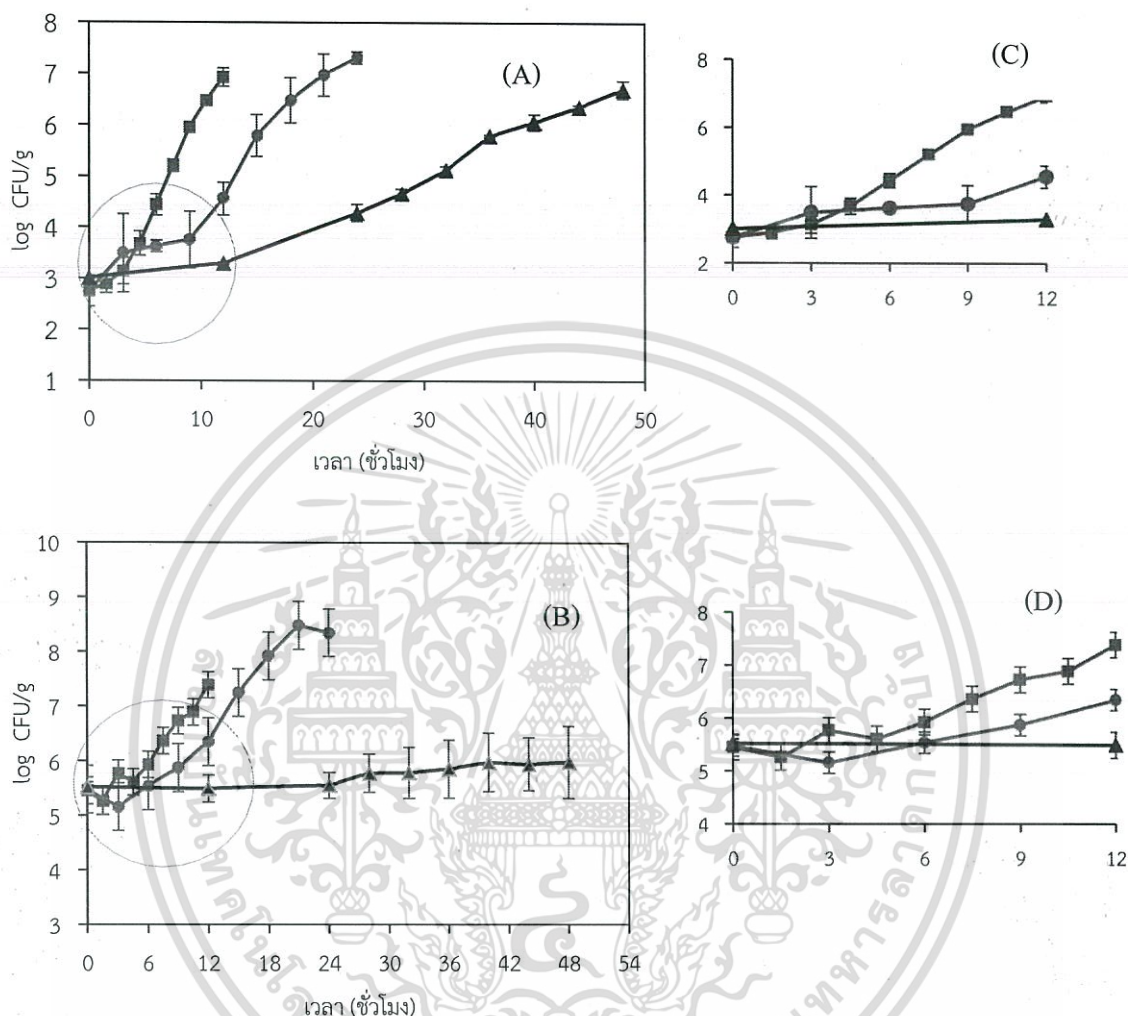
จากผลการทดลองนี้ พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญและการเข้าสู่ระยะ lag phase, log phase และ stationary phase ของ *M. morgani* อย่างไรก็ตาม เชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นต่ำ จะใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อจนถึง $10^8 - 10^9$ CFU ต่อกรัม เพื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase นานกว่าเชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นสูง โดยที่ระยะเวลาสิ้นสุดการทดลองที่ 24 ชั่วโมง เชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นต่ำ ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น 5 log CFU ต่อกรัม (จาก 2.75 เป็น 7.31 log CFU ต่อกรัม) ในขณะที่เชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นสูง เชื้อเพิ่มขึ้น 3 log CFU ต่อกรัม (จาก 5.47 เป็น 8.35 log CFU ต่อกรัม) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) ที่รายงานว่า การเจริญของ *R. ornithinolytica* ที่มีปริมาณเริ่มต้นต่ำ เพิ่มขึ้น 5 log (จาก 2 เป็น 7.7 log CFU ต่อกรัม) ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นสูง เพิ่มขึ้น 3 log (จาก 5 ไป 8.5 log CFU ต่อกรัม)

สำหรับการเจริญของเชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นต่างกันที่อุณหภูมิอื่น ๆ ให้รูปแบบการเจริญในลักษณะเดียวกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสู่ช่วงการเจริญแต่ละช่วงอาจแตกต่างกัน ซึ่งจะอภิปรายในรายละเอียดในหัวข้อผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อต่อไป

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *M. morgani* ในปลาทูน่าท้องแถบ

การเจริญของเชื้อในตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้นต่ำ อัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 3 อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส การเจริญเป็นไปอย่างช้า ๆ ใน 3 ชั่วโมงแรก แสดงถึง ระยะพัก (lag phase) แล้วจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจาก ในขั้นตอนเตรียมเชื่อนั้น แม้ว่าจะบ่มกล้าเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ในขั้นตอนการเตรียม

ตัวอย่างปลาคนั้น ทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส โดยเก็บรักษาเนื้อปลาในน้ำแข็งระหว่างรอ จึงอาจส่งผลให้เชื้อมีระยะพัก ก่อนที่จะเจริญต่อไป และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 12 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6.93 log CFU ต่อกรัม



ภาพที่ 4.2 การเจริญของ *M. morgani* ในปลาทูนที่องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2 log CFU ต่อกรัม (A) และ 5 log CFU ต่อกรัม (B) ที่อุณหภูมิ 15 (▲) 25 (●) และ 35 องศาเซลเซียส (■) ส่วนกราฟ (C) และ (D) คือกราฟขยายช่วง 12 ชั่วโมงของ (A) และ (B)

เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.2) พบว่า รูปแบบการเจริญในช่วงต้น แสดง lag phase อย่างชัดเจน ซึ่งปริมาณเชื้อไม่มีความแตกต่างจากที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จนภายหลังการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เชื้อจึงมีอัตราการเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญต่ำกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส จึงทำให้จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงเวลาเดียวกัน เช่น ที่ 12 ชั่วโมง การบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 4.56 และ 6.93 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเพิ่มเป็น 7.31 log CFU ต่อกรัม ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง หรือ 2 เท่าของการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า เชื้อชนิดนี้ เป็นกลุ่ม mesophile ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (Baylis, 2006)

เมื่อลดอุณหภูมิในการบ่มลงเหลือ 15 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.2) พบว่า เชื้อมีการเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ และไม่พบลักษณะ exponential curve ซึ่งแตกต่างจากการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิดังกล่าวไม่ค่อยเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้ การบ่มที่ 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 3.29 log CFU ต่อกรัม เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการบ่มที่ 48 ชั่วโมง เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 6.70 log CFU และการเจริญของเชื้อยังไม่อยู่ในระยะ stationary phase ทั้งนี้ จากผลการศึกษาของ Kim *et al.* (2002) ที่เติม *M. organii* ในเนื้อปลาแม็กเคอเรลบดปริมาณ 10^6 CFU ต่อกรัม พบว่าที่ 15 องศาเซลเซียส เชื้อใช้ระยะเวลาเจริญ 48 ชั่วโมง จึงถึง stationary phase ดังนั้น เชื้อที่เริ่มต้นปริมาณ 10^5 CFU ต่อกรัม จึงใช้ระยะเวลาเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง

สำหรับตัวอย่างปลาที่เติมเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 4.2 B และ D) พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 3 อุณหภูมิ มีรูปแบบคล้ายคลึงกับตัวอย่างที่เติมเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส การเจริญเป็นไปอย่างช้า ๆ ใน 4.5 ชั่วโมง แรก ซึ่งอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิของการตัวอย่างที่เก็บรักษาให้ต่ำอยู่ตลอดช่วงการเตรียม จึงส่งผลให้เชื้อมีระยะพัก (lag phase) ในช่วงต้น ก่อนจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมง เป็น 7.39 log CFU ต่อกรัม

เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.2) พบว่า เชื้อมีความแตกต่างจากที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ตลอดช่วงการบ่ม 12 ชั่วโมง โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 6.35 และ 7.39 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ และเพิ่มเป็น 8.35 log CFU ต่อกรัม ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการเจริญของเชื้อในระยะ stationary phase แล้ว เมื่อพิจารณาจากปริมาณเชื้อที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงของอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส (6.35 และ 7.39 log CFU ต่อกรัม) การเข้าสู่ระยะ stationary phase ของอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะช้ากว่า 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ดีกว่า

ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.2) พบว่า เชื้อมีการเพิ่มจำนวนอย่างช้า ๆ โดยไม่พบลักษณะ exponential curve เช่นเดียวกับที่พบในการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิดังกล่าวไม่ค่อยเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อชนิดนี้ แม้จะมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง โดยพบว่า ที่ระยะเวลาการบ่มที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อยังไม่แตกต่างจากปริมาณเริ่มต้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ เพิ่มขึ้นเป็น 5.52 จาก 5.49 log CFU ต่อกรัม และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการบ่มที่ 48 ชั่วโมง เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 5.97 log CFU ซึ่งการเจริญของเชื้อยังไม่อยู่ในระยะ stationary phase ทั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) ที่ศึกษาการเจริญของ *R. ornithinolytica* ในท่อนำกระป๋องที่ความเข้มข้น 10^5 CFU ต่อกรัม ซึ่งพบว่า เชื้อเจริญเร็วที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 9.1 log CFU ต่อกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง ในขณะที่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า เช่น 25 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมง ในการเพิ่มจำนวนให้ใกล้เคียงจำนวนดังกล่าว ส่วนการเข้าสู่ระยะ stationary phase นั้น ใช้เวลาจากน้อยไปมากตามระดับอุณหภูมิ โดยใช้เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37, 25 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Tsai *et al.* (2005b) ศึกษาการเจริญของ *E. aerogenes* จำนวน 5×10^5 CFU ต่อกรัม ในเนื้อปลา sailfish และปลานวลจันทร์บด พบว่า เชื้อเจริญได้ดีและเพิ่มจำนวนใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยเจริญเพิ่มขึ้นถึง 9 log CFU ต่อกรัม ในเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด ภายใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ 15 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ช้ากว่า

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ระดับ 10^2 CFU ต่อกรัม (ตารางที่ 4.2) พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของเชื้อจากอุณหภูมิต่ำน้อยไปมาก มีค่า 0.0219, 0.0608 และ 0.1068 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้เร็วที่สุด รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 25 และ 15 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับตัวอย่างเชื้อที่ระดับ 10^5 CFU ต่อกรัม ที่มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.0424 ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 0.0370 และ 0.0041 ต่อชั่วโมง ที่ 25 และ 15 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม mesophile จึงเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อที่ระดับ 10^5 CFU ต่อกรัม น้อยกว่าที่ระดับ 10^2 CFU ต่อกรัม ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเจริญของเชื้อเป็นแบบ logistic growth เชื้อที่มีความเข้มข้นสูงมีการใช้สารอาหารในการเจริญมาก ในปริมาณอาหารที่จำกัด จึงทำให้การเจริญเป็นไปได้

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของเชื้อที่อุณหภูมิ 35, 25 และ 15 องศาเซลเซียส

เชื้อตั้งต้น (CFU ต่อกรัม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)		
	15 °C	25 °C	35 °C
10^2	0.0219	0.0608	0.1068
10^5	0.0041	0.0370	0.0424

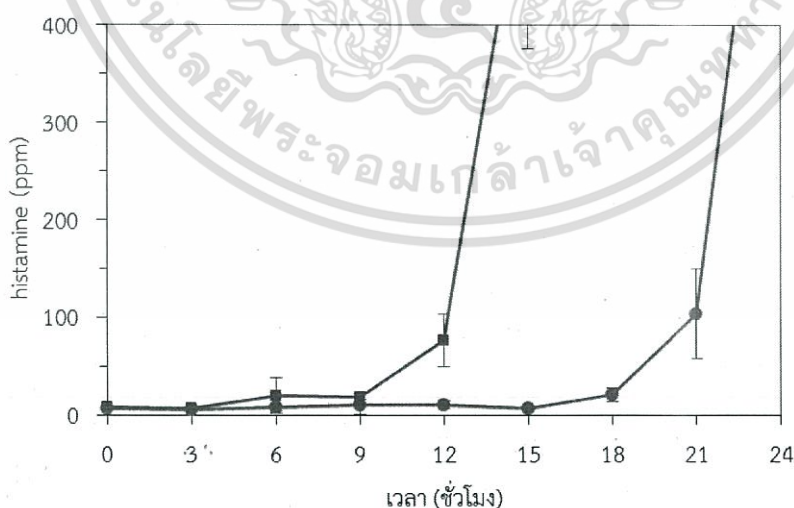
ช้ากว่า ในขณะที่เชื้อตั้งต้นที่ระดับต่ำ สามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ จึงมีอัตราการเจริญสูงกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) ดังที่ได้อภิปรายแล้วข้างต้น และการศึกษาของ Lee *et*

al. (2012) ที่พบว่า *E. aerogenes* ปริมาณเริ่มต้น 2 และ 5 log CFU ต่อกรัม เพิ่มขึ้นมากกว่าที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อเพิ่มขึ้นเพียงน้อยกว่า เมื่อเทียบ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงเท่ากัน

จากผลการทดลองนี้ อุณหภูมิจึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อทั้งปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 ระดับ ทำ ให้อัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อและระยะเวลาที่เจริญถึง stationary phase ของอุณหภูมิ 35 องศา เซลเซียส เร็วกว่า 25 และ 15 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับที่ Kim *et al.* (2000) ศึกษาการเจริญของ *M. morgani* OSL36 จำนวน 10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tuna fish infusion broth (TFIB) ที่เตรียมจากเนื้อหมู่น้ำครึบขาว ซึ่งพบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเพิ่มขึ้นและถึงระยะ stationary phase เร็วกว่าอุณหภูมิ 25 และ 15 องศาเซลเซียส ส่วน Yoshinaga and Frank (1982) ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป (ซึ่งต่อมาได้จำแนกเชื้อได้กลุ่มที่สร้างฮิสตามีน เช่น *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* เป็นต้น) ในหมู่น้ำท้องแถบ สดทั้งตัวบ่มที่ 38 องศาเซลเซียส และพบว่า เชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมินี้ โดยเพิ่มจาก 2.4 เป็น 4.8 log CFU ต่อกรัม ภายใน 12 ชั่วโมง โดยไม่มีระยะ lag phase

4.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการสร้างฮิสตามีนในปลาทูนท้องแถบ

ผลการสร้างฮิสตามีนในเนื้อหมู่น้ำครึบที่เติมเชื้อ *M. morgani* DMST 15641 2 ระดับ คือ ปริมาณ 2 และ 5 log CFU ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างๆ มีผลแสดงดัง ภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลของปริมาณเชื้อตั้งต้น (2 log CFU ต่อกรัม: ■, 5 log CFU ต่อกรัม: ●) ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของฮิสตามีน ในปลาทูนท้องแถบบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 4.2 ตัวอย่างที่เดิมเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม ในระหว่างการบ่ม พบว่า แพบไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีน โดยการเพิ่มจำนวนน้อยมากในช่วง 15 ชั่วโมงแรก จาก 6.24 เป็น 6.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้น พบการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ในลักษณะ exponential โดยที่ระยะเวลาการบ่มที่ 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 20.69 และ 764 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การสร้างฮีสตามีนจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่เชื้อเจริญมาระยะหนึ่งแล้ว ทั้งนี้ เนื่องจาก การเกิดฮีสตามีน จำเป็นต้องมีสารตั้งต้นฮีสทิดีนและเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสจำนวนหนึ่ง เอนไซม์ก็จะทำปฏิกิริยากับฮีสทิดีน และเปลี่ยนสารตั้งต้นดังกล่าวเป็นฮีสตามีน ดังนั้น ในการสร้างฮีสตามีน จำเป็นต้องเกิดการย่อยสลายตัวของปลา ทำให้เกิดฮีสทิดีน (Stratton and Taylor, 1991)

นอกจากนี้ เชื้อจะต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นดังกล่าวให้เป็น ฮีสตามีน ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการรายงานของ Kim *et al.* (2000) ที่ศึกษาการสร้างฮีสตามีนของ *M. morgani* ที่แยกได้จากทูน่าครีบน้ำเค็มใน tuna fish infusion broth จำนวน 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วพบว่า เชื้อนี้สร้างฮีสตามีนสูงสุด 5,253 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเข้าสู่ stationary phase แล้ว และยังคงคล้ายคลึงกับที่ทดลองในเชื้อชนิดอื่นๆ ดังเช่น Lin *et al.* (2012) ศึกษาในตัวอย่างเนื้อทูน่ากระป๋องที่มีเชื้อ *R. ornithinolytica* จำนวน 10^2 CFU ต่อกรัม ซึ่งพบว่า เมื่อบ่มเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง มีปริมาณฮีสตามีนสูงถึง 850 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วน Lee *et al.* (2012) ที่ศึกษาการสร้างฮีสตามีนของ *E. aerogenes* ในเนื้อทูน่าบดผสมกับกระหล่ำปลี พบว่าตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^2 CFU ต่อกรัม สร้างฮีสตามีนสูงสุด 980 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างฮีสตามีนต่างกันใน เนื่องมาจากความสามารถในการสร้างฮีสตามีนของเชื้อแต่ละชนิดต่างกัน ซึ่งจากผลการศึกษาอื่น ๆ พบว่า *M. morgani* เป็นแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่น ๆ ในวงศ์เดียวกัน ดังที่ได้อภิปรายในบทที่ 2

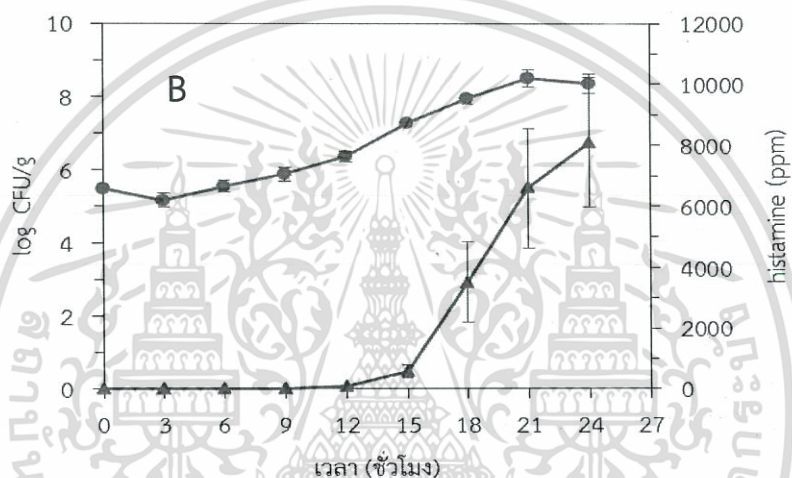
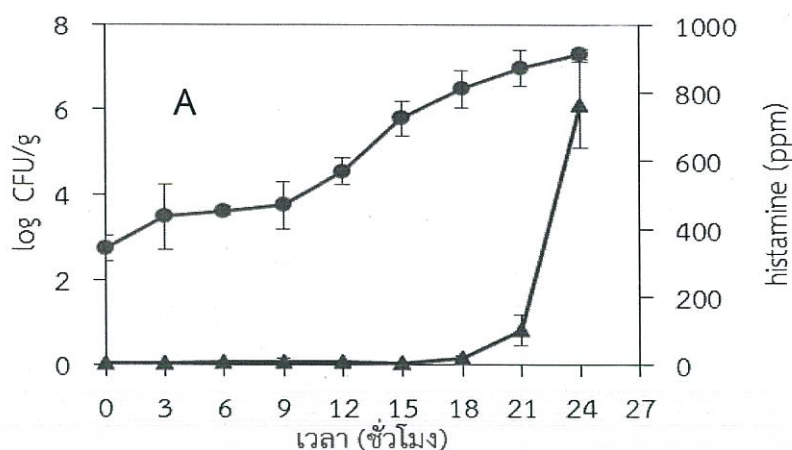
จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การเก็บปลาที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม นั้น สามารถเก็บปลาไว้ได้นาน ไม่น้อยกว่า 18 ชั่วโมง โดยปลาจะมีฮีสตามีน 20.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งยังอยู่ในระดับมาตรฐานที่สหรัฐอเมริกากำหนดสำหรับผลิตภัณฑ์ทูน่าไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FDA, 2011) อย่างไรก็ตาม ปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเพียงปริมาณเริ่มต้น แต่ไม่ใช่ปริมาณสูงสุดที่เชื้อสร้าง เนื่องจากการเจริญของเชื้อยังอยู่ในปลายของระยะ log phase หรือเข้าสู่ระยะ stationary phase แสดงให้เห็นว่า เชื้อมีโอกาสที่จะสร้างเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลส รวมถึงปฏิกิริยาสามารถดำเนินต่อไปได้ จนกว่าเอนไซม์จะสิ้นอายุ หรือไม่มีการรวม

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนของตัวอย่างที่เดิมเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม ในระหว่างการบ่ม พบว่า การเพิ่มปริมาณเกิดขึ้นรวดเร็วกว่าตัวอย่าง 2 log CFU ต่อกรัม โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มจำนวนน้อยมากในช่วง 3 ชั่วโมงแรก อยู่ในช่วง 6.81 – 7.53 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม จากนั้นพบการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ในลักษณะ exponential โดยที่ระยะเวลาการบ่มที่ 18 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 3,510 และ 8,085 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase แล้ว แสดงให้เห็นว่า การสร้างฮีสตามีนจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่เชื้อเจริญมาระยะหนึ่งแล้ว ตามที่อภิปรายแล้วข้างต้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim *et al.* (2000) ที่ได้เติมเชื้อ *M. morgani* ในปลาทูน่าคริบยาว แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase แล้ว และยังคงคล้ายคลึงกับ Lin *et al.* (2012) ที่พบว่า ฮีสตามีนที่สร้างโดยเชื้อ *R. ornithinolytica* ในเนื้อทูน่ากระป๋อง มีปริมาณสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญถึงระยะใกล้สิ้นสุด log phase และ Lee *et al.* (2012) ที่พบว่า *E. aerogenes* สร้างฮีสตามีนสูงสุดในเนื้อทูน่าบดผสมกระหล่ำปลีเมื่อเชื้อเจริญใกล้ระยะสิ้นสุด log phase เช่นกัน

จากผลการทดลองนี้ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อมีผลต่อการสร้างฮีสตามีนในเนื้อทูน่า โดยเชื้อที่มีความเข้มข้นมากจะใช้ระยะเวลาน้อยในการสร้างปริมาณฮีสตามีนจนถึงปริมาณสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างฮีสตามีนส่วนหนึ่งขึ้นกับจำนวนเชื้อที่สร้างฮีสตามีนคือคาร์บอกซีเลส (Kim *et al.* 2000) เมื่อเชื้อมีปริมาณมาก ทำให้มีการผลิตเอนไซม์จำนวนมาก และทำปฏิกิริยาเปลี่ยนฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน นอกจากนี้ ปริมาณฮีสตามีนสูงสุดพบในระยะที่เชื้อเจริญจนถึงใกล้สิ้นสุดระยะ log phase หรือ เข้าสู่ระยะ stationary phase แล้ว เชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นสูงจึงเจริญถึงระยะ stationary phase เร็วกว่าเชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) ที่เติมเชื้อ *R. ornithinolytica* ในเนื้อทูน่ากระป๋องปริมาณ 2 และ 5 log CFU ต่อกรัม พบว่า ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ใน 12 ชั่วโมงแรกสำหรับเชื้อเริ่มต้นต่ำ และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเป็น 200 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นสูงอยู่ในระยะปรับตัว 6 ชั่วโมงแรก แล้วจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 2,050 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Lee *et al.* (2012) ที่ศึกษาการสร้างฮีสตามีน โดยเติมเชื้อ *E. aerogenes* ความเข้มข้น 2 ระดับ ในทูน่าผสมกระหล่ำปลี พบว่า ตัวอย่าง 5 log CFU ต่อกรัม ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มฮีสตามีนจนถึงระดับมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม 12 ชั่วโมง น้อยกว่าตัวอย่าง 2 log CFU ต่อกรัม ที่ใช้เวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ปลาที่มีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 2 และ 5 log CFU (ภาพที่ 4.4) พบว่าการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนมีลักษณะแตกต่างกัน กล่าวคือ ปลาที่มีเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม การเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการบ่ม หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแบบ exponential ในขณะที่ปลาที่มีเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม จะมีการเพิ่มขึ้นของ ฮีสตามีนอย่างช้า ๆ จนถึง 21 ชั่วโมง แล้วจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มปริมาณเชื้อมีผลต่อการเพิ่มการสร้างฮีสตามีนในปลา



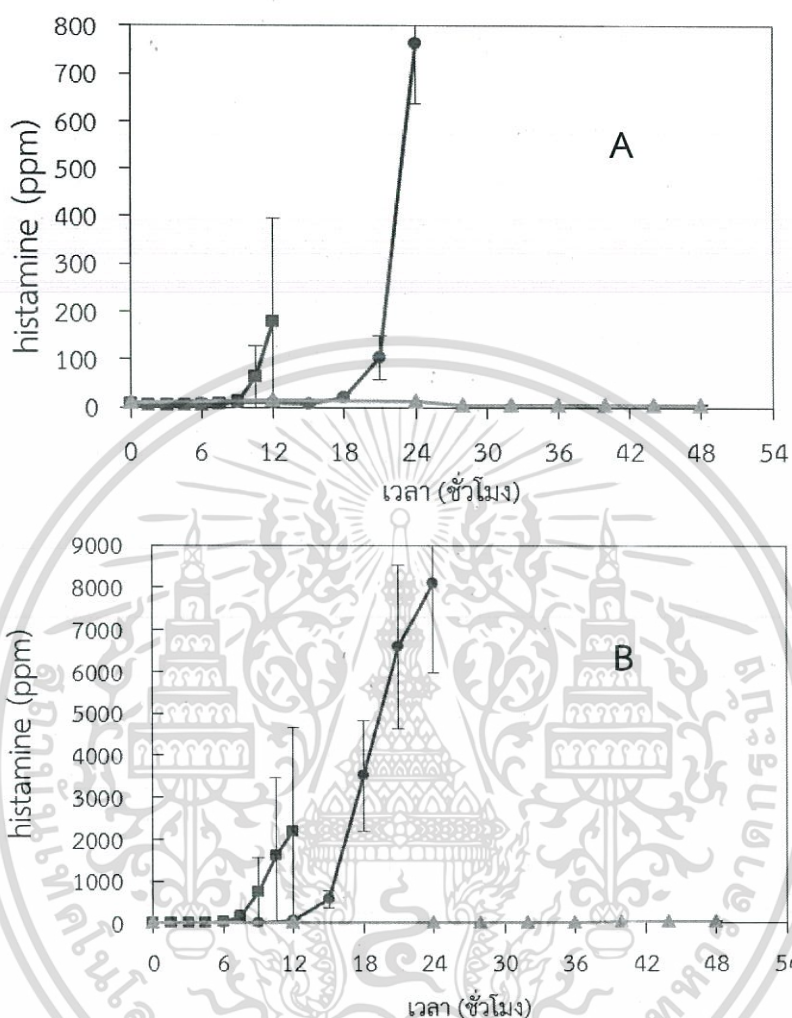
ภาพที่ 4.4 การเจริญของเชื้อ *M. morgani* (●) และการสร้างปริมาณฮิสตามีน (▲) ในปลาที่ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส (2 log CFU ต่อกรัม: A, 5 log CFU ต่อกรัม: B)

สำหรับการสร้างฮิสตามีนของเชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นต่างกันที่อุณหภูมิอื่น ๆ ให้รูปแบบการ เจริญในลักษณะเดียวกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณฮิสตามีนจนถึงระดับสูงสุดแตกต่างกัน ซึ่งจะอภิปรายในรายละเอียดในหัวข้อผลของอุณหภูมิต่อการสร้างฮิสตามีนต่อไป

4.5 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างฮิสตามีนในปลาทูน่าท้องแถบ

การสร้างฮิสตามีนในเนื้อทูน่าทอที่มีเชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ที่อุณหภูมิ 35, 25 และ 15 องศาเซลเซียส แสดงดังในภาพที่ 4.5 (A) พบว่า การเพิ่มขึ้นของฮิสตามีนทั้ง 3 อุณหภูมิมีความแตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ฮิสตามีนเพิ่มปริมาณอย่างช้า ๆ ในช่วง 7.5 ชั่วโมงแรก จาก 6.24 เป็น 5.71 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 63.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใน

เวลา 10.5 ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุดเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณฮิสตามีนเพิ่มขึ้นเป็น 179 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



ภาพที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิ (15: ▲, 25: ●, 35: ■) ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของฮิสตามีน ในปลาทูน่าที่องแแถบที่มีเชื้อตั้งต้น 2 log CFU ต่อกรัม (A) และ 5 log CFU ต่อกรัม (B)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณฮิสตามีนขึ้นอยู่กับจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างเอ็นไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซีเลส (Olley and Baranowski, 1985) โดยเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในระยะ log phase และสูงสุดในระยะ stationary phase เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ ดังที่ได้อภิปรายไปแล้วในข้อ 4.3 ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ของตัวอย่างนี้ เป็นระยะใกล้สิ้นสุด log phase ซึ่งมีเชื้อจำนวน 1.1×10^6 CFU ต่อกรัม จึงมีผลทำให้ฮิสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ฮิสตามีนเพิ่มขึ้นช้ากว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อใช้เวลาในการปรับตัวช่วงแรกนานกว่า (15 ชั่วโมง) ปริมาณฮิสตามีนคงที่อยู่ในช่วง

6.24 - 6.10 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม แล้วจึงเพิ่มขึ้นเป็น 104 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ในเวลา 21 ชั่วโมง และสูงสุด 764 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญอยู่ในช่วงปลายของ log phase (2.0×10^7 CFU ต่อกรัม) และมีฮีสทิดีนอิสระและเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสจำนวนมากในการทำปฏิกิริยาเป็นฮีสตามีน อย่างไรก็ตาม ปรากฏว่าตาม ปริมาณฮีสตามีนดังกล่าวสูงกว่ารายงานของ Ababouch *et al.* (2014) และ Dalgaard *et al.* (2006) ที่ว่า ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นในสัตว์น้ำจนถึงระดับมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม เมื่อจำนวนแบคทีเรียเจริญจนถึงระดับอย่างน้อย 10^7 CFU ต่อกรัม ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก ชนิดของแบคทีเรียและสัตว์น้ำที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน ซึ่ง *M. morganii* เป็นเชื้อที่สร้างฮีสตามีนได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่นในวงศ์เดียวกัน และท่อนำทองแถบเป็นปลาที่มีฮีสทิดีนอิสระเป็นจำนวนมากกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่น จึงทำให้ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเร็วกว่างานวิจัยที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Klausen and Huss (1987) ที่เติมเชื้อ *M. morganii* จำนวน 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน Histidine decarboxylase broth บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อเจริญจนถึงระดับ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลา 20 ชั่วโมง และฮีสตามีนสูงสุดเป็น 5,400 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ในเวลา 40 ชั่วโมง

ส่วนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยตลอดการบ่ม 48 ชั่วโมง โดยเพิ่มเป็น 4.86 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เนื่องจากการเจริญของเชื้อในตัวอย่างนี้ ยังอยู่ในระยะกลางของ log phase (5.0×10^6 CFU ต่อกรัม) จึงทำให้การสร้างฮีสตามีนเพิ่มขึ้นน้อย ซึ่ง Jay (2000) รายงานว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่ *M. morganii* สามารถสร้างฮีสตามีนได้ คือ 15 องศาเซลเซียส

สำหรับตัวอย่างเนื้อปลาที่มีเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม รูปแบบการสร้างฮีสตามีนมีแนวโน้มเช่นเดียวกับตัวอย่าง 2 log CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 4.5 B) กล่าวคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณฮีสตามีนน้อยกว่าอีก 2 อุณหภูมิ เนื่องจากเชื้อเจริญจนใกล้ระยะสิ้นสุด log phase โดยในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจาก 6.03 เป็น 2,196 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ในขณะที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 18 ชั่วโมง ในการเพิ่มฮีสตามีนเป็น 3,510 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ส่วนอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จาก 7.53 เป็น 8.35 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม ในเวลา 12 ชั่วโมง และเพิ่มเป็น 52.22 มิลลิกรัมต่อกิโกรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งยังไม่ถึงระยะปลาย log phase อย่างไรก็ตาม แม้ว่าระดับฮีสตามีนยังอยู่ในระดับปลอดภัยต่อการบริโภค แต่ลักษณะทางกายภาพของเนื้อปลาอยู่ในสภาพที่เสื่อมเสีย ไม่เหมาะสมต่อการบริโภคแล้ว

นอกจากอุณหภูมิจะมีผลทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแล้ว ยังมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซีเลสด้วย ดังที่ Eitenmiller *et al.* (1981) ศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ใน Tryptone-yeast extract broth ที่เติมเชื้อ *M. morganii* GRMO6 โดยตรวจวัดค่านาโนโมล ของคาร์บอน ไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ในสารแขวนลอยดังกล่าว พบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่านาโน โมลสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 25, 30, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นั่นคือ เอนไซม์ทำปฏิกิริยาดีที่สุดในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การศึกษาค้างนี้ พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในตัวอย่างที่มีเชื้อเริ่มต้นทั้ง 2 ระดับ โดยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีผลต่อการสร้างปริมาณฮีสตามีนมากกว่าอุณหภูมิ 25 และ 15 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาเดียวกัน (12 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เนื่องจากเชื่อว่าเป็นกลุ่ม mesophile จึงเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อมีปริมาณมาก จะช่วยทำให้การย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาโดยวิธีการ autolysis และปลดปล่อยฮีสทิดีนอิสระที่เป็นสารตั้งต้นของการสร้างฮีสตามีนมากขึ้น (Stratton and Taylor, 1991) นอกจากนี้ จำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นจะผลิตเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลสเป็นจำนวนมาก เพื่อทำปฏิกิริยากับฮีสทิดีนเปลี่ยนเป็นฮีสตามีน (Hungerford, 2010) สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin *et al.* (2012) และ Lee *et al.* (2012) ที่เดิมเชื่อความเข้มข้น 2 ระดับนี้ในตัวอย่างเนื้อหมู และหมู่น้ำผสมทะเล่าปลี ตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สร้างฮีสตามีนได้มากกว่าอุณหภูมิ 25 และ 15 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกันของตัวอย่างเชื้อทั้ง 2 ระดับนี้ นอกจากนี้ Kim *et al.* (2002) ศึกษาการสร้างฮีสตามีนในหมู่น้ำครีบยาวและปลาอื่น ๆ ที่เดิม *M. morgani* จำนวน 10^6 CFU ต่อกรัม พบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สร้างฮีสตามีนอย่างรวดเร็วสูงถึง 900 – 1,460 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง เร็วกว่าอุณหภูมิ 25 และ 15 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Frank *et al.* (1981) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสร้างฮีสตามีนในหมู่น้ำท้องแถบ โดยพบว่า ปลาสดที่มีฮีสตามีนเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 591 - 3,690 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยจำนวนแบคทีเรียเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีน ดังที่ได้อภิปรายมาแล้วข้างต้น และ Behling and Taylor (1982) ที่เดิม *M. morgani* 110SC2 และ JM ใน Tuna infusion broth พบว่า เชื้อสร้างฮีสตามีนได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจำนวนเชื้อมีผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีนในระหว่างการเก็บรักษาเช่นกัน

นอกจากนี้ พบว่า ฮีสตามีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ log phase แล้ว ทั้งการบ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 25 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นสูงมีปริมาณฮีสตามีนใกล้เคียงระดับที่ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภคคือ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นต่ำยังอยู่ในระดับความปลอดภัยที่กำหนดตลอดช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค เมื่อผ่านระยะเวลา 21 ชั่วโมง ไปแล้ว สำหรับเชื้อเริ่มต้นต่ำ และ 12 ชั่วโมง สำหรับเชื้อตั้งต้นสูง การทดลองนี้สอดคล้องกับ Kim *et al.* (2002) ที่รายงานว่าฮีสตามีนจะสร้างสูงสุดเมื่อ *M. morgani* เจริญจนถึงระยะ stationary phase เช่นเดียวกับ Behling and Taylor (1982) ที่รายงานว่าช่วงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาที่เอนไซม์ฮีสทีดีนคีคาร์บอกซีเลสทำปฏิกิริยาสูงสุดคือช่วงปลาย log phase และ Frank *et al.* (1981) รายงานว่าฮีสตามีนจะเริ่มสร้างเมื่อเชื้อเจริญผ่านช่วง lag phase ไปแล้ว ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลา 6-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37.8 องศาเซลเซียส โดยฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และฮีสตามีนมีปริมาณสูงสุดหลังจากเข้าสู่ระยะนี้ อย่างไรก็ตาม Kim *et al.* (2000) รายงานว่า Growth phase และอุณหภูมิเหมาะสมในการสร้างฮีสตามีน จะแปรเปลี่ยนไปตามชนิดและปริมาณเชื้อในสัตว์น้ำ

4.6 สมการการเจริญของเชื้อและการสร้างปริมาณฮีสตามีน

4.6.1 สมการทำนายการเจริญของเชื้อ *M.morganii*

ผลการสร้างสมการในระดับปฐมภูมิ (primary model) เพื่ออธิบายการเจริญของเชื้อ *M. morganii* ในอุณหภูมิต่าง ๆ ทั้ง 4 รูปแบบ คือ แบบเส้นตรง (linear) เอกซ์โพเนนเชียล (exponential) และโพลีโนเมียลกำลังสอง และกำลังสามของเชื้อ *M. morganii* เริ่มต้น 10^2 CFU ต่อกรัมปลาชุกา แสดงดังในตารางที่ 4.3

สมการทำนายการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสที่สร้างขึ้นมาจากชุดข้อมูลในการทดลองไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมง พบว่า สมการเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนาย (standard error of estimate: SEE) ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสมการเอกซ์โพเนนเชียลและโพลีโนเมียล แสดงว่าสมการเส้นตรงไม่เหมาะสมในการทำนายการเจริญของเชื้อได้ ดังจะกล่าวในรายละเอียดถัดไป เมื่อพิจารณาสมการการเจริญของเชื้ออีก 3 แบบ พบว่า สมการเอกซ์โพเนนเชียลมีค่า R^2 สูงที่สุด หรือเท่ากับ 0.777 ซึ่งเมื่อเทียบกับสมการกำลังสอง และสมการกำลังสาม พบว่า มีค่า 0.336 – 0.382 ตามลำดับ ทั้งนี้ ค่า R^2 ในการวิเคราะห์สมการถดถอย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับตัวแปรตาม สมการถดถอยที่ได้จะสามารถใช้ทำนายค่าของตัวแปรตามได้ดีเพียงใด ขึ้นกับอิทธิพลของตัวแปรต้นว่าจะส่งผลอย่างไรกับตัวแปรตาม โดยถ้าค่ายังมีค่าเข้าใกล้ 1.0 มากเพียงใด แสดงว่าสามารถอธิบายค่าของตัวแปรตามได้ดี เนื่องจากตัวแปรต้นกับตัวแปรตามมีความสัมพันธ์กันมาก ในทางตรงกันข้าม ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของตัวแปรตามได้ไม่ดี หรือตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันน้อย ดังนั้น สมการเอกซ์โพเนนเชียลจึงมีความเหมาะสมมากกว่า

เมื่อตรวจสอบค่า SEE ที่หมายความว่าถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปรตาม หรือ ปริมาณเชื้อที่ได้จากการทำนาย เมื่อเปรียบเทียบกับค่าจากการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกับเส้นกราฟถดถอยที่ได้จากการทำนาย หรือกล่าวได้ว่า ปริมาณเชื้อที่ทำนายจากสมการมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลอง หรือเข้าใกล้ศูนย์ แสดงถึงความแม่นยำในการทำนาย แต่ถ้ามีค่ามาก

แสดงว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่ามาก หรือข้อมูลรอบ ๆ เส้นกราฟถดถอยมีการกระจายมาก การทำนายค่าของ

ตารางที่ 4.3 สมการทำนายการเจริญของเชื้อ *M. morgani* DMST 15641 ในปลาที่เชื้อเริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม

อุณหภูมิ (°C)	รูปแบบ	สมการ	R ²	SEE
15	linear	$N = -620358 + 39990 t$	0.187	1.2E6
	Quadratic	$N = 240776 - 79298 t + 2456 t^2$	0.336	1.1E6
	Cubic	$N = -56413 + 75780 t - 5935 t^2 + 114 t^3$	0.382	1.1E6
	Exponential	$N = 449.4 e^{0.155t}$	0.777	1.2
25	linear	$N = -4.5E6 + 740333 t$	0.507	5.7E6
	Quadratic	$N = 1.9E6 - 1.1E6 t + 75681 t^2$	0.752	4.1E6
	Cubic	$N = -69580 + 317,579 t - 78,308 t^2 + 4277 t^3$	0.785	3.8E6
	Exponential	$N = 345.7 e^{0.466t}$	0.905	1.2
35	linear	$N = -1.7E6 + 534382 t$	0.422	2.5E6
	Quadratic	$N = 1.0E6 - 1.0E6 t + 129729 t^2$	0.709	1.8E6
	Cubic	$N = -339559 + 912141 t - 297786 t^2 + 23750 t^3$	0.81	1.4E6
	Exponential	$N = 197.9 e^{0.886t}$	0.961	0.7

หมายเหตุ t = เวลา (ชั่วโมง); N = ปริมาณเชื้อ (CFU ต่อกรัม)

ตัวแปรตามจากการใช้เส้นกราฟถดถอยก็จะผิดพลาดมากขึ้น พบว่าสมการเอกซ์โพเนนเชียลมีค่าเพียง 1.2 ในขณะที่สมการรูปแบบอื่นๆ มีค่าระหว่าง $1.1 \times 10^6 - 1.2 \times 10^6$ แสดงว่าสมการเอกซ์โพเนนเชียลที่มีรูปแบบเป็น e^t มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายการเจริญของเชื้อ *M. morgani* ที่มีปริมาณเริ่มต้น 10^2 CFU ต่อกรัมได้ดีที่สุด

เมื่อวิเคราะห์สมการในการทำนายปริมาณเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.3) พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน และเมื่อพิจารณาจากค่า R² ที่สูง และค่า SEE

ที่ต่ำ เป็นเกณฑ์ พบว่าสมการที่เหมาะสมที่สุด เป็นรูปแบบสมการเอกซ์โพเนนเชียลเช่นกัน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.905 และ 0.961 และ SEE โดยมีค่าเท่ากับ 1.2 และ 0.7 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากสมการแบบเอกซ์โพเนนเชียลทั้ง 3 ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.3) พบว่า มีค่าคงที่ที่ลดลง คือ 449, 345 และ 197 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าสัมประสิทธิ์ของ Euler number (e) ของสมการที่อุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้น มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.155, 0.466 และ 0.886 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึง อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่มีเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าที่ยกกำลังมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่า ระยะเวลาในการบ่มก็มีอิทธิพลด้วยเช่นกัน

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความสัมพันธ์ปริมาณเชื้อ *M. morganii* เริ่มต้น 10^5 CFU ต่อกรัมปลาทUNA กับระยะเวลาในการบ่ม แสดงดังในตารางที่ 4.4 พบว่า ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.4 สมการทำนายการเจริญของเชื้อ *M. morganii* DMST 15641 ในปลาที่เชื้อเริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม

อุณหภูมิ (°C)	รูปแบบ	สมการ	R^2	SEE
15	linear	$N = -32011 + 35895 t$	0.196	1.1E6
	Quadratic	$N = 343409 - 16109 t + 1071 t^2$	0.233	1.1E6
	Cubic	$N = 353781 - 21521 t + 1363 t^2 - 4 t^3$	0.233	1.1E6
	Exponential	$N = 264343 e^{0.027t}$	0.144	1.0
25	linear	$N = -3.4E7 + 5.7E6 t$	0.421	4.7E7
	Quadratic	$N = 1.8E7 - 9.8E6 t + 700675 t^2$	0.729	3.2E7
	Cubic	$N = 1.3E6 + 1.6E6 t - 590431 t^2 + 36984 t^3$	0.767	3.0E7
	Exponential	$N = 83566 e^{0.279t}$	0.730	1.2
35	linear	$N = -4.7E7 + 1.2E7 t$	0.588	5.5 E7
	Quadratic	$N = 8.2E6 - 9.6E6 t + 1.3E6 t^2$	0.774	4.1E7
	Cubic	$N = 6.9E6 - 8.4E6 t + 1.2E6 t^2 + 6566 t^3$	0.774	4.1E7
	Exponential	$N = 127834 e^{0.468t}$	0.888	0.9

หมายเหตุ t = เวลา (ชั่วโมง); N = ปริมาณเชื้อ (CFU ต่อกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการการเจริญของเชื้อทั้ง 4 แบบ มีค่า R^2 ระหว่าง 0.144 - 0.233 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้น ได้ไม่ดี หรือจำนวนเชื้อที่ระยะเวลาในการเจริญมีความสัมพันธ์กันน้อยมาก แม้ว่าในการพลอตกราฟปริมาณเชื้อที่ระยะเวลาการบ่มจะมีรูปแบบคล้ายกับสมการเส้นตรง ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการเติมเชื้อในปริมาณมาก ทำให้รูปแบบการเจริญเปลี่ยนไป สมการที่ได้จึงยังไม่สามารถอธิบายการเจริญของเชื้อได้อย่างเหมาะสม

เมื่อวิเคราะห์สมการในการทำนายปริมาณเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าให้ผลในแนวโน้มที่ดีขึ้น โดยสมการมีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.421 - 0.767 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้น ได้ดี หรือจำนวนเชื้อที่ระยะเวลาในการเจริญมีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตาม สมการเส้นตรงมีค่า R^2 ต่ำที่สุด จึงพิจารณาสมการเอกซ์โพเนนเชียลและพอลิโนเมียลแทน พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.729 - 0.767 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นได้ดีกว่า และเมื่อพิจารณาค่า SEE ที่มีค่าอยู่ระหว่าง $1.2 - 4.7 \times 10^7$ พบว่า สมการยกกำลังสอง และ สมการยกกำลังสามที่มีค่า SEE เท่ากับ 3.2×10^7 และ 3.0×10^7 ตามลำดับ แสดงถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่ามาก หรือข้อมูลรอบ ๆ เส้นกราฟถดถอยมีการกระจายมาก การทำนายค่าของตัวแปรตามจากการใช้เส้นกราฟถดถอยก็จะผิดพลาดมากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกสมการเอกซ์โพเนนเชียลมาใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ และ ระยะเวลาการบ่ม เช่นเดียวกับการบ่มเชื้อเริ่มต้นที่ 10^2 สำหรับสมการในการทำนายปริมาณเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่สูงและ SEE ที่ต่ำ จึงเลือกสมการเอกซ์โพเนนเชียลในการทำนายปริมาณเชื้อ โดยมีค่า R^2 และ SEE เท่ากับ 0.888 และ 0.9 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากสมการแบบเอกซ์โพเนนเชียลของการทำนายปริมาณเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า มีค่าคงที่ที่เพิ่มขึ้น จาก 83,566 เป็น 127,834 และค่าสัมประสิทธิ์ของออยเลอร์ของสมการที่อุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้น มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.2795 เป็น 0.468 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึง อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่มีเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า แสดงว่า อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

4.6.2 สมการทำนายการสร้างฮีสตามีน

การสร้างสมการในการทดลองนี้ เป็นการสร้างสมการในระดับปฏิกิริยาเพื่ออธิบายการสร้างปริมาณฮีสตามีนโดยเชื้อ *M. morgani* ในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยนำปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นในแต่ละระยะเวลาของแต่ละอุณหภูมิมาสร้างสมการทางคณิตศาสตร์แบบถดถอยทั้ง 4 แบบ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ซึ่งจะได้รับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นหรือตัวแปรอิสระ (เวลา) และตัวแปรตาม (ปริมาณฮีสตามีน) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความสัมพันธ์การสร้างฮีสตามีนของเชื้อเริ่มต้น 10^2 CFU ต่อกรัมปลาทูน่า ที่ระยะเวลาในการบ่ม แสดงดังในตารางที่ 4.5

เมื่อพิจารณาตามหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกสมการที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อ พบว่า สมการการสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นแบบสมการยกกำลังสาม เนื่องจากมีค่า R^2 เท่ากับ 0.746 สูงกว่าสมการรูปแบบอื่น และมีค่า SEE ค่อนข้างต่ำ หรือเท่ากับ 2.2

ตารางที่ 4.5 สมการทำนายปริมาณฮีสตามีนในปลาที่เติมเชื้อ *M. organii* เริ่มต้น 2 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	รูปแบบ	สมการ	R^2	SEE
15	linear	$H = 12 - 0.2t$	0.433	3.1
	Quadratic	$H = 11.1 - 0.1t - 0.003t^2$	0.454	3.2
	Cubic	$H = 8.9 + 1.1t - 0.1t^2 + 0.001t^3$	0.746	2.2
	Exponential	$H = 11.9 e^{-0.024t}$	0.447	0.4
25	linear	$H = -119.5 + 18.6t$	0.365	195.5
	Quadratic	$H = 99.8 - 43.8t + 2.6t^2$	0.694	137.7
	Cubic	$H = -39.5 + 55.6t - 8.4t^2 + 0.305t^3$	0.883	86.5
	Exponential	$H = 2.2 e^{0.169t}$	0.622	1.1
35	linear	$H = -26.7 + 9.8t$	0.196	78.8
	Quadratic	$H = 26.4 - 20.5t + 2.5t^2$	0.348	72.1
	Cubic	$H = -1.0 + 18.7t - 6.1t^2 + 0.5t^3$	0.405	69.9
	Exponential	$H = 3.0 e^{0.184t}$	0.370	1.0

หมายเหตุ t = เวลา (ชั่วโมง); H = ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของปริมาณฮีสตามีนได้ดี หรือปริมาณฮีสตามีนกับระยะเวลาในการบ่มมีความสัมพันธ์กัน ส่วนสมการอื่นนั้น ไม่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากมีค่า R^2 ที่ต่ำ คือ อยู่ระหว่าง 0.433 - 0.454 แม้ว่าจะมีค่า SEE ต่ำเช่นกัน โดยมีค่าระหว่าง 0.4 - 3.2 ดังนั้น จึงเลือกสมการยกกำลังสามในการทำนายปริมาณฮีสตามีน

เมื่อวิเคราะห์สมการในการทำนายฮีสตามีนที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.5) พบว่า ให้ผลในแนวโน้มที่ดีขึ้น โดยสมการมีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.365 – 0.883 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นได้ดี หรือปริมาณฮีสตามีนกับระยะเวลาในการสร้างมีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตาม สมการเส้นตรงมีค่า R^2 ต่ำที่สุด จึงพิจารณาสมการเอกซ์โพเนนเชียลแทน พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.622 – 0.883 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นได้ดีกว่า และเมื่อพิจารณาค่า SEE ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 1.1 – 195.5 พบว่า สมการยกกำลังสอง มีค่า SEE เท่ากับ 137.7 แสดงถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่ามาก หรือข้อมูลรอบ ๆ เส้นกราฟถดถอยมีการกระจายมาก การทำนายค่าของตัวแปรตามจากการใช้เส้นกราฟถดถอยก็จะผิดพลาดมากขึ้น ส่วนสมการเอกซ์โพเนนเชียลที่มีค่า SEE เท่ากับ 1.1 แต่ค่า R^2 เท่ากับ 0.622 ดังนั้น จึงเลือกสมการยกกำลังสามมาใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮีสตามีน และ ระยะเวลาการบ่ม ส่วนสมการการสร้างฮีสตามีนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.5) ทั้ง 4 แบบ มีค่า R^2 ระหว่าง 0.196 - 0.405 แสดงว่า สมการถดถอยจะอธิบายค่าของปริมาณฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นได้ไม่ดี หรือปริมาณฮีสตามีนกับระยะเวลาในการเจริญมีความสัมพันธ์กันน้อยมาก ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการเติมเชื้อในปริมาณมาก ทำให้รูปแบบการเจริญเปลี่ยนไป และมีผลต่อการสร้างฮีสตามีน ทำให้สมการที่ได้จึงยังไม่สามารถอธิบายการสร้างฮีสตามีนได้อย่างเหมาะสม

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความสัมพันธ์การสร้างฮีสตามีนของเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU ต่อกรัมปลาช่อนกับระยะเวลาในการบ่ม แสดงดังในตารางที่ 4.6 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่า สมการการสร้างฮีสตามีน เป็นแบบออยเลอร์ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.722 เมื่อตรวจสอบค่า SEE พบว่า มีค่า 0.37 ซึ่งเมื่อเทียบกับสมการรูปแบบอื่นๆ อีก 3 แบบ (linear, quadratic, cubic) ที่สร้างขึ้นมาจากชุดข้อมูลในการทดลองไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมง สมการเอกซ์โพเนนเชียลที่มีรูปแบบเป็น e^x มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายการสร้างฮีสตามีนที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU ต่อกรัม มากที่สุด

เมื่อวิเคราะห์สมการในการทำนายปริมาณฮีสตามีนที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าสมการที่ได้ทั้งหมดไม่สามารถอธิบายการสร้างฮีสตามีนได้อย่างเหมาะสม เนื่องจากมีค่า R^2 ต่ำ โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วง 0.289 – 0.407 และ 0.287 – 0.416 ตามลำดับ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากปลาแต่ละรุ่นมีคุณภาพความสดไม่เหมือนกัน ไม่สามารถควบคุมปริมาณอิสระซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการสร้างฮีสตามีนได้ โดยแต่ละรุ่นอาจมีปริมาณฮีสทิดีนอิสระไม่เท่ากัน บางรุ่นอาจมีฮีสทิดีนอิสระมากกว่า และพร้อมที่จะเปลี่ยนเป็นฮีสตามีน เมื่อเติมเชื้อเข้าไป และมีการเจริญ จึงสามารถสร้างฮีสตามีนได้ทันที ในขณะที่ปลาบางรุ่นมีปริมาณอิสระน้อยกว่า จึงใช้เวลานานกว่าในการเพิ่มฮีสตามีน จึงทำให้ค่าเบี่ยงเบนของปริมาณฮีสตามีนมีมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 สมการทำนายปริมาณฮีستามีนในปลาที่เดิมเชื้อ *M. morgani* เริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	รูปแบบ	สมการ	R ²	SEE
15	linear	$H = -2.0 + 0.8 t$	0.502	12.2
	Quadratic	$H = 9.4 - 0.8 x + 0.03 t^2$	0.670	10.1
	Cubic	$H = 7.4 + 0.3 x - 0.02 t^2 + 0.001 t^3$	0.684	10.0
	Exponential	$H = 5.4 e^{0.040t}$	0.722	0.37
25	linear	$H = -699.6 + 125.1 t$	0.289	1563.7
	Quadratic	$H = 220.5 - 137.8 t + 11 t^2$	0.391	1468.4
	Cubic	$H = 93.5 - 46.6 t + 0.873 t^2 + 0.280 t^3$	0.394	1487.8
	Exponential	$H = 9.3 e^{0.166t}$	0.407	1.6
35	linear	$H = -466.7 + 167.1 t$	0.287	1048.8
	Quadratic	$H = 171.1 - 197.3 t + 30.4 t^2$	0.397	979.3
	Cubic	$H = 50.4 - 24 t - 7.9 t^2 + 2.1 t^3$	0.403	988.8
	Exponential	$H = 7.3 e^{0.332t}$	0.416	1.6

หมายเหตุ t = เวลา (ชั่วโมง); H = ปริมาณฮีستามีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

จากผลการวิเคราะห์การถดถอยด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ตัวแปรเดียว (เวลา) สามารถสรุปสมการที่ใช้ได้อย่างเหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยการเจริญของเชื้อเป็นไปตามลักษณะเอกซ์โพเนนเชียล อุณหภูมิและระยะเวลาเป็นปัจจัยสำคัญทำให้จำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้นแบบยกกำลัง โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของออยเลอร์ (e) ของสมการที่เพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่า R² และค่าความคลาดเคลื่อนจากเส้นกราฟถดถอยแล้ว สมการนี้สามารถใช้ในการทำนายการเจริญของเชื้อได้อย่างถูกต้องตามสภาวะอุณหภูมิและปริมาณเชื้อเริ่มต้นตามที่กำหนด อย่างไรก็ตาม ยังมีบางสภาวะที่ไม่สามารถสร้างสมการถดถอยในการทำนายได้ เช่น การหาปริมาณเชื้อในสภาวะการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ (15 องศาเซลเซียส) ของเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูง เนื่องจากมีระยะ lag time นาน และเชื้อเจริญอย่างช้า ๆ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮีستามีน สมการพหุนามแบบกำลังสาม สามารถใช้ในการทำนายได้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างเหมาะสม โดยพิจารณาจากค่า R^2 และค่า MSE อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของเชื้อเริ่มต้นสูง และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ของเชื้อเริ่มต้นทั้งต่ำและสูง ยังไม่สามารถสร้างสมการถดถอยได้

ตารางที่ 4.7 สรุปสมการทำนายการเจริญของเชื้อและปริมาณฮีสตามีนในเนื้อหมู่น่าบด

อุณหภูมิ (°C)	CFU/g	การเจริญของเชื้อ	การสร้างฮีสตามีน
15	10^2	$N = 449 e^{0.155t}$	$H = 8.94 + 1.09 t - 0.06 t^2 + 0.001 t^3$
	10^5	ไม่มี	$H = 5 e^{0.040t}$
25	10^2	$N = 345 e^{0.466t}$	$H = -39 + 55 t - 8 t^2 + 0.305 t^3$
	10^5	$N = 83566 e^{0.279t}$	ไม่มี
35	10^2	$N = 197 e^{0.886t}$	ไม่มี
	10^5	$N = 127834 e^{0.468t}$	ไม่มี

หมายเหตุ t = เวลา (ชั่วโมง); N = ปริมาณเชื้อ (CFU ต่อกรัม); H = ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

4.6.3 การทำนายปริมาณฮีสตามีนโดยสมการโลจิสติก (logistic model)

ในการทำนายปริมาณฮีสตามีนโดยสมการโลจิสติก $His_t = His_0 + Y_{His/CFU} \times (N_t - N_0)$ (Dalgaard, 2002) ต้องใช้ค่า yield factor ($Y_{His/CFU}$) หรือผลได้ของฮีสตามีน มาคำนวณ โดยค่า yield factor มาจากผลต่างของค่าฮีสตามีนสูงสุดลบด้วยค่าฮีสตามีนเริ่มต้นหารด้วยผลต่างของจำนวนเชื้อสูงสุดลบด้วยจำนวนเชื้อเริ่มต้น $(His_{max} - His_0)/(CFU_{max} - CFU_0)$ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ มีเฉพาะตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เชื้อเจริญถึงจุดสูงสุดคือ stationary phase ในการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนโดยสมการโลจิสติก จึงใช้เฉพาะชุดการทดลองดังกล่าว

เมื่อแทนค่าในสมการแล้ว ปริมาณฮีสตามีนที่ได้จากการทำนายตามระยะเวลาต่าง ๆ แสดงดังในตารางที่ 4.8 โดยพบว่า ปริมาณฮีสตามีนที่ได้จากการทำนายมีค่าน้อยกว่าค่าจริง 293% ในช่วง 3 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้ออยู่ในระยะ lag phase หลังจากนั้น ในช่วง 9 - 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นของระยะ log phase และฮีสตามีนเริ่มเพิ่มปริมาณขึ้น ค่าที่ได้จากการทำนายมากกว่าค่าจริง 25-31% ในช่วงที่ฮีสตามีนเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว คือ หลังจาก 12 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณฮีสตามีนที่ได้จากการทำนายมีตั้งแต่ร้อยละ 5 ถึง 27% มีเฉพาะช่วง 21 ชั่วโมงที่มากกว่า 7%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ปริมาณฮีสตามีน (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่ได้จากการทำนายและจากการตรวจวิเคราะห์จริงในปลาที่เติมเชื้อ *M. morgani* เริ่มต้น 5 log CFU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เวลา (ชม.)	ปริมาณฮีสตามีน		ความต่าง (%)
	วิเคราะห์จริง	ทำนาย	
3	8.88	2.26	-293
6	12.04	12.81	6
9	20.56	27.40	25
12	52.72	76.83	31
15	425.20	403.18	-5
18	2398.00	2024.37	-18
21	4964.00	5317.21	7
24	6252.00	4908.16	-27

ค่า $Y_{His/CFU} = 0.00002727$ ไมโครกรัมต่อกรัม

จากการทำนายปริมาณฮีสตามีนโดยใช้สมการแบบโลจิสติก 2 ตัวแปร (เวลา และ ปริมาณเชื้อ) พบว่า สามารถใช้ได้ดีในตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยค่าที่ได้จากการทำนายมากกว่าค่าจริงในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งปริมาณฮีสตามีนยังไม่เกินค่ามาตรฐานความปลอดภัยที่ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ log phase แล้ว ค่าทำนายส่วนใหญ่น้อยกว่าค่าจริง อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่สำคัญที่ต้องควบคุมการเกิดฮีสตามีนคือ ช่วงต้นของระยะ log phase ก่อนที่จะเพิ่มปริมาณจนมากกว่าระดับความปลอดภัย ดังนั้น การใช้สมการของ Dalgaard (2002) จึงเหมาะสมในการทำนายฮีสตามีนโดยมีตัวแปรร่วมเป็นเวลาและจำนวนเชื้อได้ อย่างเหมาะสม เมื่อเชื้อได้เจริญจนถึงระยะ log phase แล้ว

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 เนื้อปลาที่เติมเชื้อ *M. morgani* มีการเจริญเติบโตตามลักษณะการเจริญของเชื้อทั่วไป โดยพบทั้ง ระยะ lag phase, log phase และ stationary phase โดยมีระยะ lag phase ที่แตกต่างกัน ยกเว้น เนื้อปลาที่บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ

5.1.2 ความเข้มข้นของเชื้อมีผลต่อทั้งการเจริญและการสร้างฮีสตามีนในเนื้อปูนา โดยการบ่มปลาที่มีเชื้อเริ่มต้นความเข้มข้นมาก จะใช้ระยะเวลาสั้นกว่าในการเพิ่มปริมาณ และ สร้างฮีสตามีนได้สูงกว่า

5.1.3 อุณหภูมิมีผลต่อทั้งการเจริญและการสร้างฮีสตามีนในเนื้อปูนา โดยการเพิ่มอุณหภูมิในการบ่ม ส่งผลให้ปริมาณเชื้อและปริมาณฮีสตามีนเพิ่มสูงขึ้น และการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณฮีสตามีนสูงกว่าระดับที่ยอมรับได้ ในเวลาเพียง 9 ชั่วโมง (เชื้อตั้งต้นต่ำ) และ 6 ชั่วโมง (เชื้อตั้งต้นสูง) อย่างไรก็ตาม เมื่อสิ้นสุดการบ่มที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 และ 12 ชั่วโมง ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 763 และ 179 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับเชื้อตั้งต้นต่ำ และ 8,085 และ 2,196 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับเชื้อตั้งต้นสูง

5.1.4 ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อและเวลา ตามความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นและอุณหภูมิ สามารถอธิบายได้ด้วยสมการเอกซ์โพเนนเชียล มีค่า R^2 ระหว่าง 0.730 – 0.961 และ SEE ระหว่าง 0.7 – 1.2 ตามลำดับ และไม่สามารถหาสมการในการทำนายที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ของเนื้อปลาที่มีเชื้อปริมาณเริ่มต้นสูง ส่วนความสัมพันธ์ของปริมาณฮีสตามีนและเวลาในการบ่มพบว่า เนื้อปลาที่บ่มอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสมการที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อต่ำ สามารถอธิบายด้วยสมการแบบยกกำลังสาม แต่ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อสูงสามารถอธิบายได้ด้วยสมการเอกซ์โพเนนเชียล สำหรับการบ่มปลาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสมการได้เฉพาะที่ความเข้มข้นของเชื้อต่ำ ส่วนที่ความเข้มข้นสูง และการบ่มปลาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างสมการที่เหมาะสมได้ นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากในการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ และ ฮีสตามีนในเนื้อปลา

5.1.5 สมการ โลจิสติกแบบ 2 ตัวแปร (เวลาและจำนวนเชื้อ) ของ Dalgaard (2002) สามารถใช้ในการทำนายฮีสตามีนได้อย่างเหมาะสมในช่วงเริ่มต้นของการเจริญของเชื้อในระยะ log phase

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การทดลองในครั้งนี้ มีข้อจำกัดในเรื่องคุณภาพของปลา เนื่องจากปลาที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง ชุดละ 4 - 6 ตัว ไม่สามารถนำมาจากปลาชนิดเดียวกันได้ ปลาที่มาจากคนละรุ่น จะมาจากเรือจับปูหน้าคนละลำ ซึ่งเรือแต่ละลำจะมีวิธีการดูแลรักษาปลาก่อนการแช่แข็งในเรือ เพื่อขนถ่ายมายังฝั่งไม่เหมือนกัน ปลาที่มีการแช่แข็งทันทีหลังจากจับจะมีความสดมากกว่าปลาที่ถูกปล่อยทิ้งไว้ก่อนการแช่แข็ง นอกจากนี้ อุณหภูมิแช่แข็งและการเก็บรักษาระหว่างการขนถ่ายปลาที่แช่แข็งแล้วมายังฝั่ง ล้วนมีผลต่อความสด ปริมาณฮีสทิตินอิสระ และฮีสตามีนดั้งเดิมของปลาแต่ละรุ่น คุณภาพปลา หรือความสดของปลาที่นำไปใช้เป็นตัวล่อในการทดลอง จึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีน จึงควรกำหนดคุณภาพปลาให้ใกล้เคียงกันมากที่สุด ในทุกชุดการทดลอง และควรเพิ่มการทดสอบความสดของปลา โดยวิธี total volatile base เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปลาสดและฮีสตามีน ทำให้สมการการทำนายการเจริญของเชื้อ และการสร้างฮีสตามีน มีความถูกต้องเหมาะสมมากยิ่งขึ้น

5.2.2 วิเคราะห์ปริมาณฮีสทิตินอิสระในเนื้อปลาก่อนการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบความสดและควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ในการเจริญของเชื้อและการสร้างฮีสตามีน เช่น อุณหภูมิเริ่มต้นของปลาเมื่อเริ่มบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อลดความแตกต่างของผลที่ได้จากการทดลองแต่ละชุด

5.2.3 เพิ่มชนิดเชื้อที่สร้างฮีสตามีน เพื่อทดสอบว่า ในกรณีที่มีเชื้อที่สร้างฮีสตามีนมากกว่า 1 ชนิดในเนื้อปลา จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนเหมือนกับที่มีเชื้อชนิดเดียวหรือไม่

5.2.4 ศึกษาเพิ่มเติมชนิดเชื้อที่สร้างฮีสตามีนที่ปนเปื้อนในโรงงานของประเทศไทย รวมทั้งปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อน โดยทั่วไป เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาโอกาสการปนเปื้อนเชื้อที่สร้างฮีสตามีนในโรงงาน เนื่องจากการทดลองนี้ศึกษาเฉพาะ *M. organii* ที่ระดับ 10^2 และ 10^3 CFU ต่อกรัม

บรรณานุกรม

กรมประมง. 2558. มาตรฐานทางเคมีสำหรับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (ตามประเทศผู้นำเข้า). กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. ออนไลน์ www.fisheries.go.th/quality (9 ธันวาคม 2559).

กรมประมง. 2555. ข้อกำหนดการจักระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤตในการผลิตผลิตภัณฑ์ประมง. กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2.

กรมประมง. 2552. ข้อกำหนด สุขลักษณะการผลิตผลิตภัณฑ์ประมงบรรจุภาชนะปิดสนิท และ สุขลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาทูน่า. กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2552. บทปฏิบัติการการเก็บเชื้ออ้างอิง. เอกสารการอบรมเชิงปฏิบัติการ.

ชญาสินี บุญคำ และวงศ์ทิพา โรจนประภพ. 2559. การเปลี่ยนแปลงฮิสตามีนในกระบวนการผลิตทูน่ากระป๋องจากทูน่าลอยน้ำนำเข้า. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2559. กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง กรมประมง. 28 หน้า.

ชั้นยาภรณ์ คงจันทร์ หรือหวี ทองด้วง และดวงเดือน ศรีชาย. 2549. ศึกษาคุณภาพและความปลอดภัยของฮิสตามีนในปลาโอแถบ (skipjack tuna) นำเข้าและผลิตภัณฑ์บรรจุกระป๋อง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 11/2549 กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง. 12 หน้า.

นลินี หงษ์ชุมพล ธรวิทย์ อุปพงษ์ จิระวรรณ พึ่งสกุล อมรรัตน์ หาญดี๊ วิชาญ ป่าวัน มุทิตะ ชลา มาตย์ ชุตติกาญจน์ งามนักร ปวีณา วงศ์สุวรรณค์ อมรา ทองหงษ์ ตำเริง ภูระหงษ์ และ โสภณ เอี่ยมศิริถาวร. 2550. การสอบสวนการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากสารฮิสตามีนในปลา. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ปีที่ 38 ฉบับที่ 36, 2-8 กันยายน 2550 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. หน้า 629-636.

นิตานาด ตันชัยย์ ชญาสินี บุญคำ และศิริพร ชัยจักร. 2551. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาทูน่าในระหว่างการผลิตทูน่ากระป๋อง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 14/2551 กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง 24 หน้า.

บังอร เหม้ง และสรชัย สิ้นสุวรรณ. เทคนิคการตรวจสอบและการประเมินคุณภาพอาหารด้วยวิธีการทางเคมี. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. ออนไลน์ <http://humaneco.stou.ac.th/UploadedFile/71414-5.pdf> (วันที่ 4 พฤษภาคม 2560).

สมศักดิ์ วรคามิน. 2550. เอนไซม์ กุญแจแห่งชีวิต. พิมพ์ครั้งที่ 2. สามเจริญพาณิชย์. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศูวิมล กิระศิริวิทยากรณ์ และ วริพัทธ์ อารีกุล. 2559. การประเมินความปลอดภัยของสารพิษฮีสตามีนในทูน่าที่องแถบ (*Katsuwonus pelamis*) สด ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ. การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 14 วันที่ 1-2 พฤศจิกายน 2559 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก. 316-321.
- อรัญ หันพงษ์กิตติกุล. 2555. เทคโนโลยีเอนไซม์ (Enzyme technology). พิมพ์ครั้งที่ 2 ฉบับปรับปรุง. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่.
- Ababouch, L., Emborg, J. and Dalgaard, P. 2014. Histamine and other biogenic amines. 78-91. in Ryder, J., Iddya, K. and Ababouch, L., editors. Assessment and management of seafood safety and quality, FAO Fisheries and aquaculture technical paper No.574. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Ababouch, L., Afilal, M. E., Rhafiri, S. and Busta, F. F. 1991. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25 °C). Food Microbiol. 8 : 127-136.
- Allen, D. G., Green, D. P., Bolton, G. E. L., Jaykus, A. and Cope, W. G. 2005. Detection and identification of histamine-producing bacteria associated with harvesting and processing mahimahi and yellowfin tuna. J. Food Prot. 68 : 1676-1682.
- Antoine, F. R., Wei, C. I., Littell, R. C., Quinn, B. P., Hogle, A. D. and Marshall, M. R. 2001. Free amino acids in dark- and white-muscle fish as determined by o-phthalaldehyde recolumn derivatization. Food Chem. Toxicol. 66(1) : 72-77.
- Association of Official Analytical Chemists. 2000. Official Methods of Analysis, 17th Ed. Gaithersburg. Maryland.
- Association of Official Analytical Chemists. 2015. Official Methods of Analysis, 19th Ed. Section 35.1.32. AOAC Official method 977.13. Gaithersburg. Maryland.
- Baylis, C. L. 2006. Enterobacteriaceae. 624-660. in Blackburn, C. W., editor. Food spoilage microorganisms, Woodhead Publishing Ltd. England.
- Behling A. R. and Taylor, S. L. 1982. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. J. Food Sci. 47 : 1311-1314, 1317.
- Ben-Gigirey, B., Baptista DE Sousa, J. V., Villa, T. G. and Barros-Velazquez, J. 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). J. Food Prot. 62 : 933-939.

- Chen, H. C., Kung, H. F., Chen, W. C., Lin, W. F., Hwang, D. F., Lee, Y. C. and Tsai, Y. H. 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chem.* 106 : 612-618.
- Chong, C. Y., Bakar, F. A., Russly, A. R., Jamilah, B. and Mahyudin, N. A. 2011. Mini review the effects of food processing on biogenic amines formation. *Int. Food Research J.* 18 : 867-876.
- Dalgaard, P. 2002. Modelling and predicting the shelf-life of seafood. 191-219. *in* Bremner, H. A., editor. *Safety and quality issues in fish processing.* CRC Press, Cambridge, England.
- Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N. and Emborg, J.. 2006. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J. Appl. Microbiol.* 101, : 80-95.
- Du, W. X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R. and Wei, C. I. 2002. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) : effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *J. Food Sci.* 67 : 292-301.
- Economou, V., Brett, M. M., Papadopoulou, C., Frillingos, S. and Nichols, T. 2007. Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. *Food Add. Cont.* 24 : 820-832.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 9(10) : 2393-2487. [online]. Available at <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>. (2 January 2017).
- Eitenmiller, R. R., Wallis, J. W., Orr, J. H. and Phillips, R. D. 1981. Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morgani*. *J. Food Prot.* 44 : 815-820.
- Eitenmiller, R. R. and Souza, S. C. 1984. Enzymatic mechanisms for amine formation in fish. 431-451. *in* Ragelis, E. P., editor. *Seafood toxins.* American Chemical Society, Washington D.C.
- Emborg J. and Dalgaard, P. 2006. Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *J. Food Prot.* 69 : 897-906.

- Emborg, J. and Dalgaard, P. 2008a. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on formation by *Morganella psychrotolerans*. *Int. J. Food Microbiol.* 128 : 226-233.
- Emborg, J. and P. Dalgaard, 2008b. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella moganii* – development and evaluation of predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 128 : 234-243.
- FAO/WHO (Food Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization). 2013. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. Meeting report.
- FDA (US Food and Drug Administration). 2011. Chapter 7: Scombrototoxin (histamine) formation. 113-151. *in* Fish and fishery products hazard and controls guidance. 4th edition. Office of Seafood. Washington D.C.
- FDA (US Food and Drug Administration). CPG Sec. 540.525 Decomposition and Histamine Raw, Frozen Tuna and Mahi-Mahi; Canned Tuna; and Related Species. [online]. Available at <https://www.fda.gov/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm074506.htm> (10 January 2017).
- Fletcher, G. C. 2011. Using predictive models for the shelf-life and safety of seafood. 237-250. *in* Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K. and Wanasundara, U., editors. Handbook of seafood quality, safety and health applications. Wiley-Blackwell.
- Frank H. A. 1985. Use of nomographs to estimate histamine formation in tuna. 252:18-20. *in* Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. Pan, B. S. and James, D., editors. FAO Fish. Tech. pap.
- Frank, H. A., Yoshinaga, D. H. and Nip, W. K. 1981. Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. *Mar. Fish Rev.* 43(10) : 9-14.
- Gram, L. and Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33 : 121-137.
- Guillier, L., Thebault, A., Gauchard, F., Pommepey, M., Guignard, A. and Malle, P. 2011. A risk-based sampling plan for monitoring of histamine in fish products. *J. Food Prot.* 74 : 302-310.

- Guizani, N., Al-Busaidy, M. A., Al-Belushi, I. M., Mothershaw, A. and Rahman, M. S. 2005. The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Res. Int.* 38 : 215-222.
- Hu Y., Huang, Z., Li, J. and Yang, H. 2012. Concentrations of biogenic amines in fish squid and octopus and their changes curing storage. *Food Chem.* 135 : 2604-2611.
- Huang, Y. R., Liu, K. J., Hsieh, H. S., Hsieh, C. H., Hwang, D. F. and Tsai, Y. H. 2010. Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan. *Food Control.* 21 : 1234-1239.
- Hungerford, J. M. 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon.* 56 : 231-243.
- Hwang, C. C., Kung, H. F., Lin, C. S., Hwang, D. F. and Tsai, Y. H. 2011. Bacteriological quality and histamine-forming bacteria associated with fish meats and environments in HACCP and non-HACCP fish processing factories. *Food Control.* 22 : 1657-1662.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. 2005. Virus and some other proven and suspected foodborne biohazards. 727-745. *in* Modern Food Microbiology. 7th Ed. Springer. New York.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. and Baba, E. 2007. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Env. Microbiol.* 73(5) : 1467-1473.
- Kerr, M., Lawicki, P., Aguirre, S. and Rayner, C. 2002. Effect of storage conditions on histamine formation in fresh and canned tuna. Public Health Division, Victorian Government Department of Human Services. Australia.
- Kim, S. H., An, H. and Price, R. J. 1999. Histamine formation and bacterial spoilage of albacore harvested off the U.S. Northwest coast. *J. Food Sci.* 64(2) : 340-343.
- Kim, S. H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R. J. and An, H. 2000. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *J. Food Prot.* 63 : 244-251.
- Kim, S. H., Field, K. G., Morrissey, M. T., Price, R. J., Wei, C. I. and An, H. 2001. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. *J. Food Prot.* 64 : 1035-1044.

- Kim, S. H., Price, R. J., Morrissey, M. T., Field, K. G., Wei, C. I. and An, H. 2002. Histamine production by *Morganella morganii* in Mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. *J. Food Sci.* 67 : 1522-1528.
- Kim, S. H., An, H., Wei, C. I., Visessanguan, W., Benjakul, S., Morrissey, M. T., Su, Y. C. and Pitta, T. P. 2003. Molecular detection of a histamine former, *Morganella morganii*, in albacore, mackerel, sardine, and a processing plant. *Food Chem. Toxicol.* 68 : 453-457.
- Kim, M. K., Mah, J. H. and Hwang, H. J. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem.* 116 : 87-95.
- Kimura, B., Konagaya, Y. and Fuji, T. 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. *Int. J. Food Microbiol.* 70 : 71-77.
- Klausen, N. K. and Huss, H. H. 1987. Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 5 : 147-156.
- Kollanoor-Johny, A., Baskaran, S. A. and Venkitanarayanan, K. 2012. Microbiology terms applied to food safety. 33-44. *in* Oyarzabal, O. A. and Backert, S., editors. *Microbial food safety, An introduction*. Springer. New York.
- Koral, S., Tufan, B., Scavnicar, A., Kocar, D., Pompe, M. and Kose, S. 2013. Investigation of the contents of biogenic amines and some food safety parameters of various commercially salted fish products. *Food Control.* 32 : 597-606.
- Krizek, M., Vacha, F., Vejsada, P. and Pelikanova, T. 2011. Formation of biogenic amines in fillets and minced flesh of three freshwater fish species stored at 3 °C and 15 °C. *Acta Vet. Brno.* 80 : 365-372. Doi : 10.2754/avb201180040365.
- Kung, H. F., Tsai, Y. H., Wei, C. I. 2007. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chem.* 101 : 351-356.
- Lawley, R., Curtis, L. and Davis, J. 2012. Scombrototoxin (Histamine). 334-338. *in* The food safety hazard guidebook. 2nd Ed. RSC Publishing.
- Lee, Y. C., Kung, H. F., Lin, C. S., Hwang, C. C., Lin, C. M., and Tsai, Y. H. 2012. Histamine production by *Enterobacter aerogenes* in tuna dumpling stuffing at various storage temperatures. *Food Chem.* 131 : 405-412.
- Lehane, L. and Olley, J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58:1-37.

- Leuschner, R., Hristova, A., Robinson, T. and Hugas, M. 2013. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food. *J. Food Comp. Anal.* 29 : 37-42.
- Lin, C. M., Kung, H. F., Huang, Y. L., Huang, C. Y., Su, Y. C. and Tsai, Y. H. 2012. Histamine production by *Raoultella ornithinolytica* in canned tuna meat at various storage temperatures. *Food Control* 25 : 723-727.
- Liu H., Zhu, J., Hu, Q. and Rao, X. 2016. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *Int. J. Infect. Dis.* 50 : 10-17.
- Lopez-Sabater, E. I., Rodriguez-Jerez, J. J., Roig-Sagues, A. X. and Mora-Ventura, M. T. 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J. Food Prot.* 57 : 318-323.
- Lopez-Sabater, E. I., Rodriguez-Jerez, J. J., Hernandez-Herrero, M., Roig-Sagues, A. X. and Mora-Ventura, M. T. 1995. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). *J. Food Prot.* 59 : 167-174.
- Lopez-Sabater, E. I., Rodriguez-Jerez, J. J., Hernandez-Herrero, M. and Mora-Ventura, M. T. 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *Int. J. Food Microbiol.* 28 : 411-418.
- Lum K. 2012. Safety of fish and seafood products. 159-172. in Oyarzabal, O. A. and Backert, S., editors. *Microbial food safety, An introduction*. Springer. New York.
- McLauchlin, J., Little, C. L., Grant, K. A. and Mithani, V. 2005. Scombrototoxic fish poisoning. *J. Public Health.* 28 : 61-62.
- Middlebrooks, B. L., Toom, P. M., Douglas, W. L., Harrison, R. E. and McDowell, S. 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J. Food Sci.* 53 : 1024-1029.
- Nahla, T. K. and Farag, H. El-S. M. 2005. Histamine and histamine producing bacteria in some local and imported fish and their public health significance. *Research J. Agric. Biol. Sci.* 1 : 329-336.
- Naila A., Flint, S., Fletcher, G. C., Bremer, P. J. and Meerdink, G. 2011. Biogenic amines and potential histamine-forming bacteria in Rihaakuru (a cooked fish paste). *Food Chem.* 128 : 479-484.

- Nollet, L. M. L. and Toldra, F., editors. 2010. Handbook of seafood and seafood products analysis. CRC Press. New York.
- Olley J. and Baranowski, J. 1985. Temperature effects on histamine formation. 252:14-17. *in* B. Pan, S. and James, D., editors. Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. FAO Fish. Tech. pap.
- Oliveira, R. B. A., Evangelista, W. P. and Sena, M. J. 2012. Tuna fishing, capture and post-capture practices in the northeast of Brazil and their effects on histamine and other bioactive amines. *Food Control*. 25 : 64-68.
- Park, J. S., Lee, C. H., Kwon, E. Y., Lee, H. J., Kim, J. Y. and Kim, S. H. 2010. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control*. 21 : 1219-1226.
- Ruiz-Capillas, C. and Jimenez-Colmenero, F. 2010. Biogenic amines in seafood products. 833-850. *in* Nollet, L. and Toldra, F., editors. Handbook of seafood and seafood products analysis. CRC Press.
- Saaïd, M., Saad, B., Hashim, N. H., Ali, A. S. M. and Saleh, M. I. 2009. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chem*. 113 : 1356-1362.
- Shakila, R. J., Vijayalakshmi, K. and Jeyasekaran, G. 2003. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem*. 82 : 347-352.
- Shakila, R. J., Jeyasekaran, G., Vyla, S. A. and Kumar, R. S. 2005. Effect of delayed processing on changes in histamine and other quality characteristics of 3 commercially canned fishes. *J. Food Sci*. 70 : M24-29.
- Shalaby, A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int*. 29 : 675-690.
- Shaw, I. C. 2013. Food safety: the science of keeping food safe. Wiley-Blackwell. UK. 224-225.
- Silva, T. M., Sabaini, P. S., Evangelista, W. P. and Gloria, M. B. A. 2011. Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. *Food Control*. 22 : 323-327.
- Staruszkiewicz, W. F., Barnett, J. D., Roger, P. L., Benner, R. A., Wong, L. L. and J. Cook. 2004. Effects of on-board and dockside handling on the formation of biogenic amines in mahimahi (*Coryphaena hippurus*), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), and yellowfin tuna (*Thunus albacares*). *J. Food Prot*. 67 : 134-141.

- Stratton, J. E. and Taylor, S. L. 1991. Scombroid poisoning. 331-351. in Ward, D. R. and Hackney, C., editors. Microbiology of marine food products. AVI, New York.
- Tao, Z., Sato, M., Yamaguchi, T. and Nakano, T. 2009. Formation and diffusion mechanism of histamine in the muscle of tuna fish. Food Control. 20 : 923-926.
- Taylor, S. L., Hui, J. Y. and Lyons, D. E. 1984. Toxicology of scombroid poisoning. 417-430. in Ragelis, E. P., editor. Seafood toxins. American Chemical Society, Washington D.C.
- Taylor, S. L. 1985. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. VPH/FOS/85.1. Monograph World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Torres, S., Roeckel, M. and Mart, M. C. 2002. Histamine formation by *Morganella morganii* isolated from *Trachurus murphyi* (Chilean mackerel). Lat. Am. Appl. Res. 32 : 1-10.
- Tsai, Y. H., Lin, C. Y., Chang, S. C., Chen, H. C., Kung, H. F., Wei, C. I. and Hwang, D. F. 2005a. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. Food Microbiol. 22 : 461-467.
- Tsai, Y. H., Chang, S. C., Kung, H. F., Wei, C. I. and Hwang, D. F. 2005b. Histamine production by *Enterobacter aerogenes* in sailfish and milkfish at various storage temperatures. J. Food Prot. 68 : 1690-1695.
- Wei C. I., Chen, C. M., Koburger, J. A., Otwell, W. S. and Marshall, M. R. 1990. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. J. Food Sci. 55 : 59-63.
- Yesudhason P., Al-Zidjali, M., Al-Zidjali, A., Al-Busaidi, M., Al-Waili, A., Al-Mazrooei, N. and Al-Habsi, S. 2013. Histamine levels in commercially important fresh and processed fish of Oman with reference to international standards. Food Chem. 140 : 777-783.
- Yoshinaga D. H. and Frank, H. A. 1982. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Appl. Env. Microbiol. 44 : 447-452.

ภาคผนวก ก

วิธีการทดสอบจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี AOAC (2000)

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ด้วยวิธี เทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ในถุงสำหรับเครื่องตีปั่น (stomacher) จากนั้นเติมสารละลาย Butterfield's phosphate-buffered dilution water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร
2. นำตัวอย่างในข้อ 1 ไปตีปั่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 60 วินาที
3. จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากข้อ 2 ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย Butterfield's phosphate-buffered dilution water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเขย่าหลอด (vortex) เพื่อให้เข้ากัน ได้ตัวอย่างความเจือจางที่ระดับ 10^{-1} ทำการเจือจางด้วยวิธี Serial dilution จนคาดว่ามีความเจือจางอยู่ในช่วง 30 - 300 โคโลนี
4. ปิเปตตัวอย่าง ข้อ 3 ใส่ลงในจานเพาะเชื้อพลาสติก จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ โดยใส่จานเพาะเชื้อละ 1 มิลลิลิตร และเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar ที่ละลายและตั้งทิ้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส จำนวน 15 - 20 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเชื้อให้ตัวอย่างอาหารกระจายไปทั่ว ๆ จานเพาะเชื้อพลาสติก
5. นำไปบ่มโดยคว่ำจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง
6. นับเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มีจุลินทรีย์ 25-250 โคโลนี โดยเลือกกระดับการเจือจางติดกัน 2 ระดับ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด หน่วย cfu/g โดยใช้สูตร

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times d}$$

เมื่อ $\sum C$ = จำนวนโคโลนีที่เจริญทั้งหมดบนจานเพาะเชื้อ

n_1 = จำนวนของจานเพาะเชื้อในสารละลายเจือจางที่ 1

n_2 = จำนวนของจานเพาะเชื้อในสารละลายเจือจางที่ 2

d = สารละลายเจือจางของ dilution ที่เชื้อที่เจริญ

N = จำนวนของโคโลนี ต่อ กรัมของตัวอย่างทดสอบ

ภาคผนวก ข

วิธีการทดสอบฮีสตามีนด้วยวิธีฟลูออโรเมตริก A.O.A.C. (2015)

1. แผนภูมิวิธีการทดสอบ

ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 10 กรัม ใส่ในภาชนะโพลีโพรพีลีนขนาดประมาณ 100 มิลลิลิตร



เติมเมธานอลเข้มข้น 75% ประมาณ 50 มิลลิลิตร



homogenize ประมาณ 2 นาที เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร rinse แกนป็นของเครื่อง homogenizer และภาชนะ โพลีโพรพีลีน ด้วยเมธานอล เเทรวมในขวดวัดปริมาตร



วางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที



นำออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตั้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส



ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยเมธานอลเข้มข้น 75%



กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1



ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่กรองได้จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน column anion exchange resin



เติม purified water ประมาณ 5 มิลลิลิตร



ปล่อยให้สารละลายไหลจากคอลัมน์ลงสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

ที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 M อยู่ 5 มิลลิลิตร ในทันที



เมื่อระดับของสารละลายอยู่เหนือเรซินประมาณ 2 มิลลิเมตร ให้เติมน้ำบริสุทธิ์ประมาณ 5 มิลลิลิตร

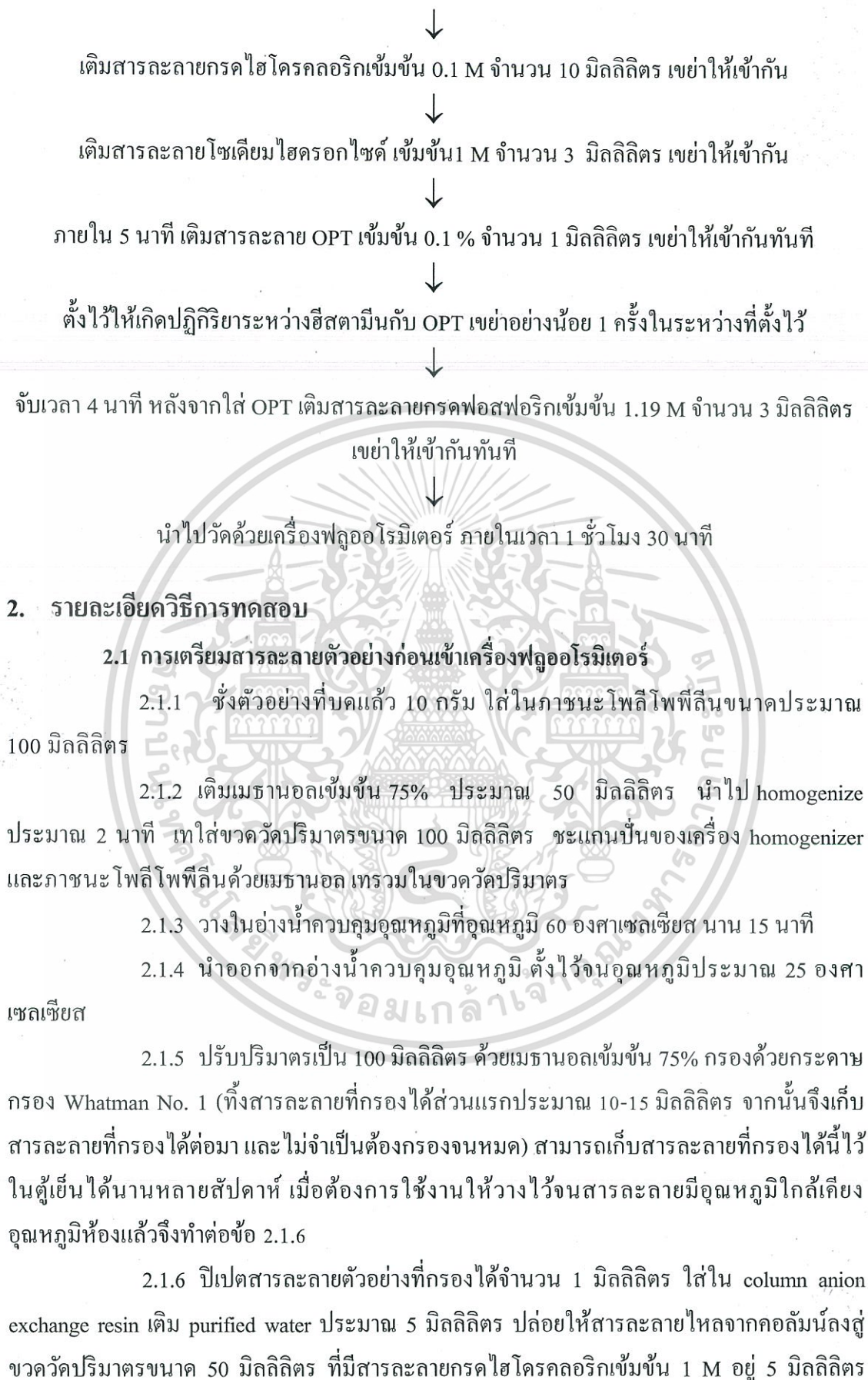
ทำเช่นนี้ จนกระทั่งสารละลายในขวดวัดปริมาตรมีปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร

นำขวดวัดปริมาตรออกจากข้างใต้ column เติมน้ำบริสุทธิ์จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน



ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ 5 มิลลิลิตร ลงในภาชนะแก้วหรือโพลีโพรพีลีนขนาด 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทันที เมื่อระดับของสารละลายอยู่เหนือเรซิน ประมาณ 2 มิลลิเมตร ให้เติม purified water ประมาณ 5 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้โดยใช้น้ำในปริมาณที่มากขึ้นจนกระทั่งสารละลายในขวดวัดปริมาตร มีปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร ปิดก๊อกคอลัมน์ นำขวดวัดปริมาตรออกจากข้างใต้คอลัมน์ เติม purified water จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2 การทำให้เกิดสารอนุพันธ์ของฮีสตามีน

2.2.1 Blank

(1) ใส่สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M จำนวน 15 มิลลิลิตร ลงในภาชนะแก้วหรือโพลีโพรพิลีน ขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 M จำนวน 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(3) ภายใน 5 นาที เติมสารละลาย OPT เข้มข้น 0.1 % จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างฮีสตามีนกับ OPT เขย่าอย่างน้อย 1 ครั้งในระหว่างที่ตั้งไว้

(4) จิบเวลา 4 นาที หลังจากใส่ OPT ให้เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 1.19 M จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที

2.2.2 Standard

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างละ 5 มิลลิลิตร (จะมีปริมาณฮีสตามีน 0.05, 0.25, 0.50, 1.00 และ 1.25 ไมโครกรัม ตามลำดับ) แยกเติมลงไปในภาชนะแก้วหรือโพลีโพรพิลีน ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(2) ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 (2) – (4)

2.2.3 ตัวอย่าง

(1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.1.6 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในภาชนะแก้วหรือโพลีโพรพิลีน ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(2) ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 (2) – 2.2.1 (4) สามารถทำปฏิกิริยา 6-10 ตัวอย่างต่อเนื่องกันใน 1 ชุด

2.3 การวัดค่า fluorescence intensity

นำสารละลาย blank, standard และตัวอย่างไปวัดค่า fluorescence intensity ด้วยเครื่องFluorometer ที่ค่า excitation wavelength 350 nm และ emission wavelength 444 nm ภายในเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

2.4 การคำนวณ

2.4.1 เขียน calibration curve ระหว่างค่า fluorescence intensity กับปริมาณฮีสตามีนในสารละลาย standard histamine 5 มิลลิลิตร (0, 0.05, 0.25, 0.50, 1.00 และ 1.25 μg)

2.4.2 กำหนดปริมาณฮีสตามีนของสารละลายตัวอย่างและ fortified sample จาก calibration curve

2.4.3 กำหนดความเข้มข้นของฮีสตามีนในตัวอย่าง ดังนี้

$$\text{ฮีสตามีน } (\mu\text{g/g}) = (C \times 1000) / W$$

โดยที่ C = ปริมาณฮีสตามีนในสารละลายตัวอย่างที่ได้จาก calibration curve (μg)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

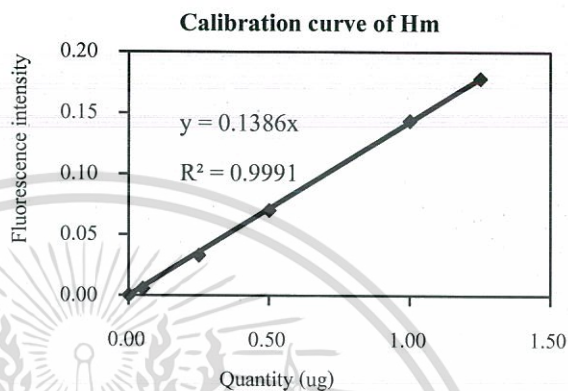


ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานฮิสตามีน (standard curve)

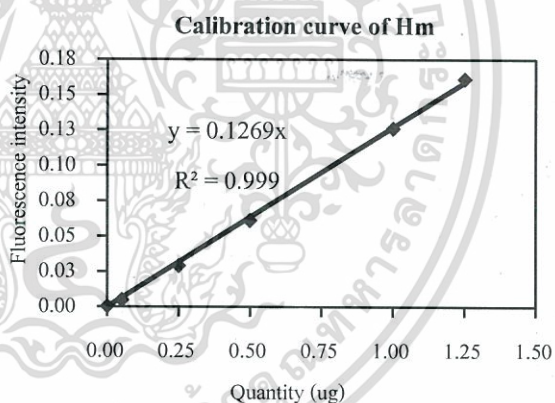
ชุดการทดลองที่ 1 (2-04-59)

Calibration Curve Of Histamine	
Quantity (ug)	Intensity
(x)	(y)
0.00	0.0000
0.05	0.0061
0.25	0.0313
0.50	0.0685
1.00	0.1367
1.25	0.1759



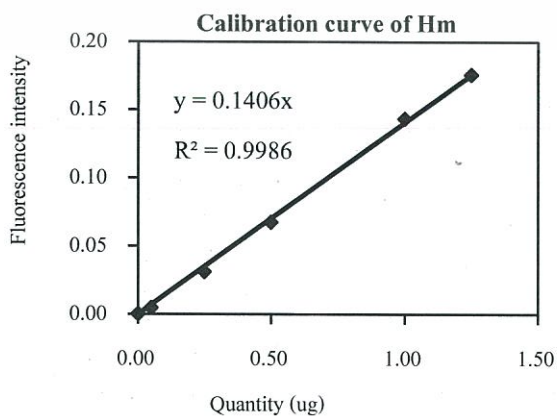
ชุดการทดลองที่ 2 (28-04-59)

Quantity (ug)	Intensity
(x)	(y)
0.00	0.0000
0.05	0.0047
0.25	0.0290
0.50	0.0611
1.00	0.1260
1.25	0.1609



ชุดการทดลองที่ 3 (4-06-59)

Quantity (ug)	Intensity
(x)	(y)
0.00	0.0000
0.05	0.0045
0.25	0.0310
0.50	0.0673
1.00	0.1432
1.25	0.1757



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลการตรวจจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g) ในตัวอย่างเนื้อปลา

REP	เนื้อปลาลดเชื้อ ^a	เนื้อบดเติมเชื้อ 10^2 CFU/g ^b	เนื้อบดเติมเชื้อ 10^5 CFU/g ^b
1	40	2.6×10^2	3.6×10^5
	25	1.3×10^2	2.5×10^5
2	10	2.7×10^2	2.4×10^5
	0	4.2×10^2	2.5×10^5
3	95	1.1×10^3	3.8×10^5
	45	9.7×10^2	2.2×10^5

^a หมายถึง ซีนเนื้อปลาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายผสมของอะซีโตนและเอธานอล อัตราส่วน 1:1 และล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ เพื่อเตรียมบดและเติมเชื้อต่อไป

^b หมายถึง เนื้อปลาลดเชื้อที่เติมเชื้อตามความเข้มข้นที่ต้องการ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ภาคผนวก จ

การเจริญของเชื้อ *M. morganii* ในเนื้อหมู่นำบดที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส

เวลาบ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อเฉลี่ย (log CFU/กรัม)			
	เชื้อตั้งต้น 2 Log CFU ต่อกรัม		เชื้อตั้งต้น 5 Log CFU ต่อกรัม	
	25 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	25 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส
3	3.49	3.14	5.15 ^a	5.76 ^b
6	3.62 ^a	4.44 ^b	5.54 ^a	5.93 ^b
9	3.75 ^a	5.95 ^b	5.87 ^a	6.73 ^b
12	4.56 ^a	6.93 ^b	6.35 ^a	7.39 ^b

a, b หมายถึง ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน ในแนวนอนของแต่ละระดับเชื้อตั้งต้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

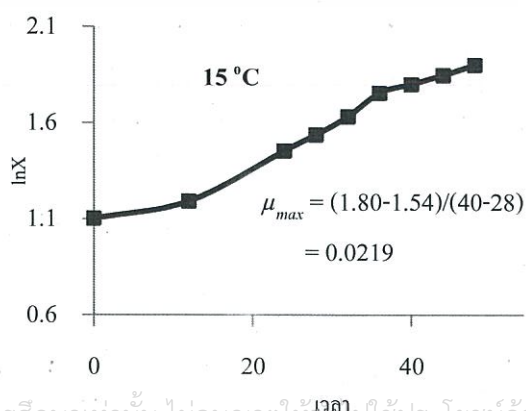
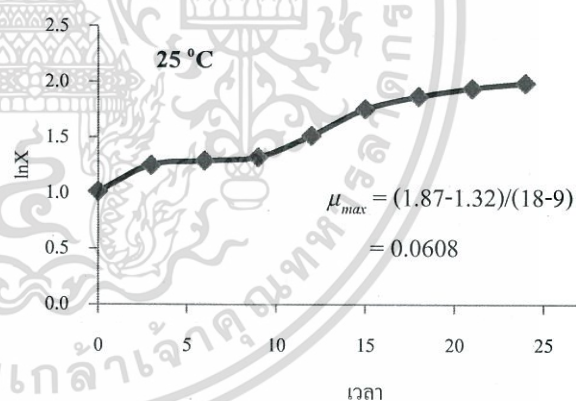
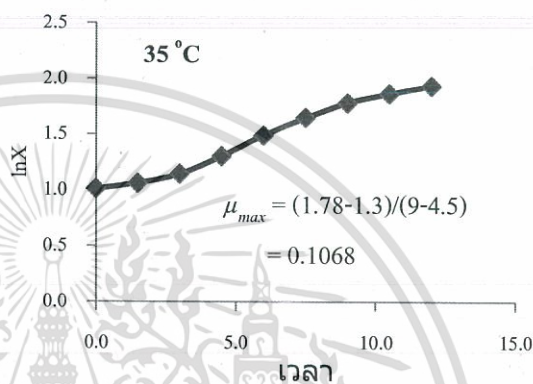
ภาคผนวก ช

การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *M. morgani* ในเนื้อทูน่าสด

อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ_{max}) = $\frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$

1. ตัวอย่างเชื้อ 10^2 CFU ต่อกรัม

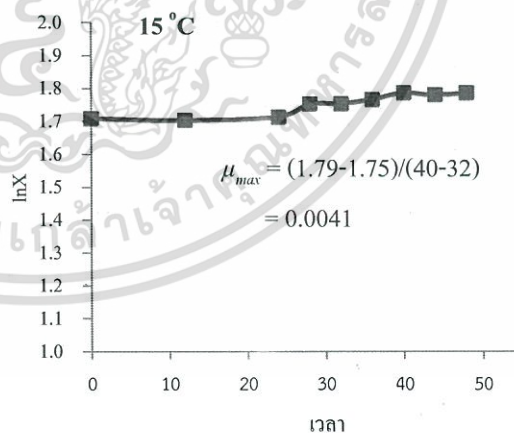
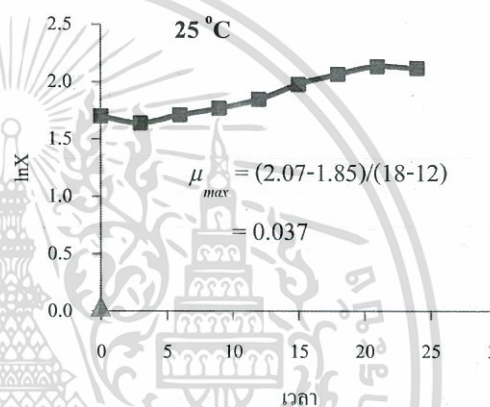
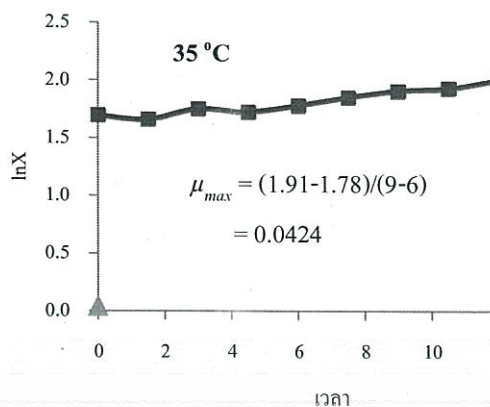
temp (°C)	Time (h)	Log CFU/g (x)	ln (x)
35	0.0	2.75	1.01
	1.5	2.89	1.06
	3.0	3.14	1.14
	4.5	3.68	1.30
	6.0	4.44	1.49
	7.5	5.20	1.65
	9.0	5.95	1.78
	10.5	6.47	1.87
	12.0	6.93	1.94
25	0	2.75	1.01
	3	3.49	1.25
	6	3.62	1.29
	9	3.75	1.32
	12	4.56	1.52
	15	5.79	1.76
	18	6.48	1.87
	21	6.97	1.94
	24	7.31	1.99
15	0	3.01	1.10
	12	3.29	1.19
	24	4.28	1.45
	28	4.66	1.54
	32	5.12	1.63
	36	5.79	1.76
	40	6.05	1.80
	44	6.35	1.85
	48	6.70	1.90



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ตัวอย่างเชื้อ 10^5 CFU ต่อกรัม

temp (°C)	Time (h)	Log CFU/g (x)	ln (x)
35	0.0	5.45	1.70
	1.5	5.26	1.66
	3.0	5.76	1.75
	4.5	5.61	1.72
	6.0	5.93	1.78
	7.5	6.36	1.85
	9.0	6.73	1.91
	10.5	6.89	1.93
	12.0	7.39	2.00
25	0	5.47	1.70
	3	5.15	1.64
	6	5.54	1.71
	9	5.87	1.77
	12	6.35	1.85
	15	7.25	1.98
	18	7.92	2.07
	21	8.48	2.14
	24	8.35	2.12
5	0	5.52	1.71
	12	5.49	1.70
	24	5.55	1.71
	28	5.78	1.75
	32	5.78	1.75
	36	5.85	1.77
	40	5.97	1.79
	44	5.94	1.78
48	5.97	1.79	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อผู้เขียน	นางสาวสุวิมล กীরติวิริยาภรณ์
ที่อยู่	88/67 หมู่บ้านปาริชาติ ถ.พุทธมณฑล 4 ต.บางกระพี้ อ.สามพราน นครปฐม
วันเดือนปีเกิด	12 พฤศจิกายน พ.ศ. 2503
การศึกษา	- พ.ศ. 2526 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี-ชีว) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ - พ.ศ. 2535 Diploma on Food Technology, Massey University, New Zealand - พ.ศ. 2560 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการความปลอดภัย อาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง
ประวัติการทำงาน	- พ.ศ. 2552 - 2559 ผู้อำนวยการกองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง กรมประมง - พ.ศ. 2559 ถึงปัจจุบัน ผู้ตรวจราชการกรมประมง
การนำเสนอผลงาน	การประเมินความปลอดภัยของสารพิษฮีสตามีนในทูน่าทองแถบ (<i>Katsuwonus pelamis</i>) สด ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 14 วันที่ 1-2 พฤศจิกายน 2559 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้