



KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากไตปลาหมัก Screening of Halophilic Bacteria Producing Protease and Lipase from Fermented Short Mackerel Innards (Tai Pla)

อรณิข เพือกคง¹ กนกรัตน์ ไสสอาด² และ ศิริพร ทวีโรจนการ^{2*}Oranit Phuakkong¹, Kanokrat Saisa-ard² and Siriporn Taweerodjanakarn^{2*}¹สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100¹Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Surat Thani, 84100, Thailand²Biology Program, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Surat Thani, 84100, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากตัวอย่างไตปลาหมักจำนวน 13 ตัวอย่าง ที่ถูกเก็บมาจากภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย ผลการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า มีค่า pH ระหว่าง 4.70 - 5.80 มีปริมาณกรดแลคติก 3.40 - 4.60% และมีปริมาณเกลือ 4.00 - 22.44% เมื่อทำการแยกแบคทีเรียชอบเค็มบนอาหาร Nutrient agar (NA) ที่มีการเติม 5% NaCl สามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มได้จำนวน 130 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี agar well diffusion พบว่ามี 24 ไอโซเลท (18.46%) ที่มีกิจกรรมการย่อยบนอาหาร Skim milk agar ซึ่งมีขนาดวงใส 10.53 - 21.36 มิลลิเมตร จากนั้นนำแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween 20 agar พบว่ามีเพียง 12 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างตะกอนขุ่นขาวขนาด 10.67 - 17.27 มิลลิเมตร โดยแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงที่สุดคือ E1-4 ซึ่งเมื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus safensis* NBRC 100820 (98.11% similarity) แสดงให้เห็นว่า E1-4 เป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ซึ่งสามารถนำไปศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

ABSTRACT

This research aimed to investigate the chemical properties of fermented short mackerel innards samples, and screen for halophilic bacteria producing protease and lipase enzymes. Thirteen samples were collected from the upper southern region of Thailand. Chemical analysis revealed pH values ranging from 4.70 to 5.80, lactic acid content of 3.40 - 4.60%, and salt content of 4.00 - 22.44%. Total 130 bacterial isolates were screened using Nutrient agar medium (NA) supplemented with 5% NaCl. Enzyme activity

*Corresponding Author, E-mail: siriporn.taw@sru.ac.th

Received date: 9 June 2025 | Revised date: 22 July 2025 | Accepted date: 24 July 2025

doi: 10.14456/kkuscij.2025.29

screening using the agar well diffusion method identified 24 isolates (18.46%) with proteolytic activity on skim milk agar, producing clear zones with diameters of 10.53 - 21.36 mm. Among these protease-producing isolates, 12 also demonstrated lipolytic activity on Tween 20 agar medium, forming white precipitates with diameters of 10.67 - 17.27 mm. Isolate E1-4 exhibited the highest proteolytic and lipolytic activities. Molecular identification based on 16S rRNA gene sequencing exhibited that E1-4 shares 98.11% similarity with *Bacillus safensis* NBRC 100820. These findings demonstrate that E1-4 represents a promising halophilic bacterium with protease and lipase-producing capabilities, making it a valuable candidate for biotechnological applications

คำสำคัญ: แบคทีเรียชอบเค็ม โปรติเอส ไลเปส ไตปลาหมึก ไตปลา

Keywords: Halophilic Bacteria, Protease, Lipase, Fermented Short Mackerel Innards, Tai Pla

บทนำ

ปัจจุบันความต้องการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี พ.ศ. 2565 ตลาดเอนไซม์ทั่วโลกมีมูลค่าประมาณ 6.95 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ และคาดการณ์ว่าระหว่างปี พ.ศ. 2566 ถึง 2593 จะเติบโตขึ้นปีละ 6.4% (Kumar *et al.*, 2024) แต่การผลิตเอนไซม์ในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังคงพึ่งพิงการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการค้นหาลำโพงจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณภาพสูงจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญสำหรับการลดการนำเข้าและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากรชีวภาพท้องถิ่น

อาหารหมักพื้นบ้านของประเทศไทยถือเป็นแหล่งที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลากหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียชอบเค็มซึ่งมีความสามารถในการอยู่รอดและเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง (Ventosa *et al.*, 1998) อีกทั้งหากเป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดแยกมาจากอาหารหมักที่มีชิ้นส่วนของเนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบ จะสามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสหรือไลเปสได้อีกด้วย โดยเอนไซม์โปรติเอสหรือไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็มสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอกและการบำบัดน้ำเสีย ตลอดจนงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้ เนื่องจากมีความเสถียรและสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะรุนแรง เช่น pH เป็นกรด ความเค็มและอุณหภูมิสูง (Margesin and Schinner, 2001) แม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้จะสามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส (อำพรธนะและคณะ, 2558; Chancharoonpong and Palagool, 2020) และเอนไซม์ไลเปส (Yiamsombut *et al.*, 2022) ได้จากปลาร้า ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้จากบูดู ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย (Kanjian and Sakpetch, 2020) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากไตปลาหมึก ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างไตปลาหมึกจากตลาดท้องถิ่นของจังหวัดในภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย เพื่อช่วยให้เข้าใจถึงองค์ประกอบและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็ม และการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากตัวอย่างไตปลาหมึก ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการพัฒนาอุตสาหกรรมเอนไซม์จากแหล่งจุลินทรีย์ท้องถิ่นและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านไทย ตลอดจนเป็นการสนับสนุนการใช้ทรัพยากรชีวภาพอย่างยั่งยืนต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและศึกษาคุณภาพทางเคมีของไคปลาทุหมัก

เก็บตัวอย่างไคปลาทุหมักจำนวน 13 ตัวอย่าง จากร้านที่จำหน่ายปลาหนึ่งในตลาดท้องถิ่นของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ตอนบน ได้แก่ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และชุมพร จังหวัดละ 3 ตัวอย่าง ระนองและพังงา จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter (Mettler Toledo MP320U, Switzerland) วิเคราะห์ปริมาณเกลือ โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม เติม 0.1 M AgNO_3 10 มิลลิลิตร และ HNO_3 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปต้มเป็นเวลา 10 นาที จนสารละลายมีสีเหลือง ปล่อยให้เย็น กรองสารละลายที่ได้และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลายอิมตัวของ $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตด้วย 0.1 M KSCN จนสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีส้ม นำไปคำนวณปริมาณเกลือโดยวิธี AOAC (2000) วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก โดยนำตัวอย่าง 10 กรัม ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หยดฟีนอลทาลีน 2 - 3 หยด จากนั้นไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วนำไปคำนวณปริมาณกรดแลกติกโดยวิธี AOAC (2000)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็ม

นำตัวอย่างไคปลาทุหมักมาแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มโดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับตีปนอาหาร (stomacher bag) เติมสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร และนำไปตีปนในเครื่อง stomacher จากนั้นทำการ spread plate ลงบนอาหาร NA ที่มีการเติม 5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส

นำแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่มีการเติม 5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปส โดยวิธี agar well diffusion ในอาหาร Skim milk agar (ประกอบด้วย 2% skim milk และ 1.5% agar) และ Tween 20 agar (ประกอบด้วย 1% peptone 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2% agar และ 1% Tween 20) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดปฏิกิริยาของแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบนอาหาร Skim milk agar และตะกอนขุนขาวบนอาหาร Tween 20 agar ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Vijayaraghavan and Vincent, 2013; Samad *et al.*, 2017; Daroonpant *et al.*, 2018)

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย Genomic DNA kits (Omega BioTek, GA, USA) ตรวจสอบ genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ใน 1% agarose gel ที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1xTAE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อม agarose gel ด้วย SYBR Gold solution เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') ได้ผลผลิต PCR ความยาว 1465 คู่เบส (Kanjana and Hongpattarakere, 2016) และทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้างหุ้นส่วน จำกัด วอร์ด เมดิค (<http://www.wardmedic.com>) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ที่เว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

5. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way-ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 23

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

คุณภาพทางเคมีของไคปลาหมึก

จากการนำตัวอย่างไคปลาหมึกจากร้านที่จำหน่ายปลาหมึกในตลาดท้องถิ่นของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ตอนบนของประเทศไทยจำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และชุมพร จังหวัดละ 3 ตัวอย่าง ระนองและพังงา จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณกรดแลคติกและเกลือ พบว่าตัวอย่างไคปลาหมึกมีค่า pH ระหว่าง 4.70 - 5.80 และมีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 5.02 ± 0.29 (ตารางที่ 1) โดยค่า pH เฉลี่ยของตัวอย่างไคปลาหมึกของแต่ละจังหวัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ยกเว้นจังหวัดสุราษฎร์ธานีที่มีค่า pH เฉลี่ยสูงที่สุด (5.41 ± 0.35) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH จากตัวอย่างไคปลาหมึกมีค่าต่ำกว่าค่า pH ของตัวอย่างไคปลาหมึกที่ไม่ระบุชนิดของปลาที่พบในจังหวัดเดียวกัน เช่น นครศรีธรรมราช ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.62 ± 0.04 (สัญญาและมณฑานต์, 2561) และในจังหวัดอื่น ๆ เช่น จังหวัดปัตตานีที่มีค่า pH ระหว่าง 5.70 - 5.73 (อุษณีย์และคณะ, 2556) โดยค่า pH ที่ต่ำในตัวอย่างไคปลาหมึกอาจสอดคล้องกับการตรวจพบกรดแลคติกในตัวอย่างที่มีค่าระหว่าง 3.40 - 4.60% และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $3.87 \pm 0.42\%$ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างไคปลาหมึกกับอาหารหมักที่มีเกลือสูงชนิดอื่น ๆ พบว่ามีปริมาณที่สูงกว่าในตัวอย่างบูดูที่มีปริมาณกรดแลคติกเพียง 1.14 - 1.95% และมีค่า pH ระหว่าง 5.57 - 6.20 (Saimmai *et al.*, 2017) ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า กลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวของไคปลาหมึกอาจมาจากการมีปริมาณกรดแลคติกสูงในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลคติก มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่าง ๆ มีกลิ่นและรสที่เป็นเอกลักษณ์

สำหรับปริมาณเกลือของตัวอย่างไคปลาหมึกพบว่า สามารถพบปริมาณเกลือได้ในช่วงกว้างระหว่าง 4.00 - 22.44% (ตารางที่ 1) โดยมีตัวอย่างที่มีปริมาณเกลือต่ำกว่า 10% 10 - 15% 16 - 20% และมากกว่า 20% จำนวน 2 5 4 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าปริมาณเกลือเฉลี่ยเท่ากับ $15.08 \pm 5.53\%$ โดยมีปริมาณใกล้เคียงกับการรายงานของสัญญาและมณฑานต์ (2561) ที่ได้ทำการศึกษาปริมาณเกลือของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่าตัวอย่างไคปลาหมึกมีปริมาณเกลือเฉลี่ย 19.77% ในขณะที่ตัวอย่างไคปลาหมึกที่ผลิตและจำหน่ายในเขตจังหวัดปัตตานีมีปริมาณเกลือสูงถึง 24.80 - 25.00% (อุษณีย์และคณะ, 2556) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถพบได้ในตัวอย่างไคปลาหมึกจะเป็นกลุ่มของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderate halophilic bacteria) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 5 - 20% (Sekar and Kim, 2020) ดังนั้น จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม 5% NaCl ในการแยกแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างไคปลาหมึก นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ปริมาณเกลือในการหมักไคปลาจะมีความแตกต่างกันในผู้ผลิตแต่ละรายหรือแต่ละพื้นที่ซึ่งแสดงถึงอัตลักษณ์ของไคปลาหมึกของผู้ผลิตรายนั้น ๆ และอาจเนื่องมาจากความต้องการของผู้บริโภคที่นิยมรับประทานไคปลาหมึกที่มีความเค็มที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ผู้ผลิตมีการเติมเกลือในปริมาณที่ต่างกันตามสูตรของตนเองเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค

ตารางที่ 1 คุณภาพทางเคมีของตัวอย่างไผ่ปลาทุหมักที่จำหน่ายในตลาดท้องถิ่นของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ตอนบน

จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	คุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์ไผ่ปลาทุหมัก		
		pH	% กรดแลคติก	% เกลือ
สุราษฎร์ธานี	A1	4.99 ± 0.01	4.69 ± 0.35	13.90 ± 0.88
	A2	5.44 ± 0.08	3.49 ± 0.17	14.96 ± 0.11
	A3	5.80 ± 0.02	3.73 ± 0.09	4.00 ± 0.36
ค่าเฉลี่ย		5.41 ± 0.35^a	3.98 ± 0.59^a	10.96 ± 5.10^b
นครศรีธรรมราช	B1	5.05 ± 0.03	3.85 ± 0.21	10.86 ± 0.67
	B2	4.79 ± 0.00	4.60 ± 0.06	15.31 ± 0.66
	B3	4.83 ± 0.02	3.40 ± 0.03	22.44 ± 0.20
ค่าเฉลี่ย		4.89 ± 0.12^b	3.95 ± 0.54^a	16.21 ± 4.93^a
ชุมพร	C1	4.70 ± 0.01	3.55 ± 0.08	21.34 ± 0.50
	C2	4.88 ± 0.02	3.41 ± 0.25	18.13 ± 0.28
	C3	4.98 ± 0.01	3.53 ± 0.09	17.43 ± 0.61
ค่าเฉลี่ย		4.86 ± 0.12^b	3.50 ± 0.16^b	18.97 ± 1.80^a
ระนอง	D1	4.87 ± 0.03	4.00 ± 0.13	19.27 ± 0.40
	D2	5.05 ± 0.02	3.93 ± 0.12	19.68 ± 0.89
ค่าเฉลี่ย		4.97 ± 0.10^b	3.97 ± 0.12^a	19.48 ± 0.63^a
พังงา	E1	4.98 ± 0.19	4.28 ± 0.12	6.76 ± 0.20
	E2	4.86 ± 0.00	3.93 ± 0.09	12.02 ± 0.14
ค่าเฉลี่ย		4.92 ± 0.14^b	4.11 ± 0.22^a	9.40 ± 2.75^b
ค่าเฉลี่ยรวม		5.02 ± 0.29	3.87 ± 0.44	15.09 ± 5.57

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างชนิดกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส

จากการนำตัวอย่างไผ่ปลาทุหมักจำนวน 13 ตัวอย่าง มาทำการแยกแบคทีเรียชอบเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีการเติม 5% NaCl และทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่ต่างกันไป ตัวอย่างละ 10 ไอโซเลท มาศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มแกรมบวกได้จำนวน 120 ไอโซเลท (92.31%) โดยมีลักษณะรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน 49 ไอโซเลท รูปร่างกลมเป็นเชลล์เดี่ยว 1 ไอโซเลท รูปร่างแท่งสั้น และแท่งยาว 65 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ และพบแบคทีเรียชอบเค็มแกรมลบจำนวน 10 ไอโซเลท (7.69%) โดยมีลักษณะรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม 6 ไอโซเลท และรูปร่างแท่งสั้น 4 ไอโซเลท ซึ่งจากการที่พบแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบในตัวอย่างไผ่ปลาทุหมักอาจเนื่องมาจากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีเปปไทโดไกลแคนที่มีความหนาประมาณ 20 - 80 นาโนเมตร ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีเพียง 7 - 8 นาโนเมตร ซึ่งการมีเปปไทโดไกลแคนที่หนากว่านี้ ช่วยให้แบคทีเรียแกรมบวกสามารถต้านทานต่อแรงดันออสโมติกได้ดีกว่า (Silhavy *et al.*, 2010) จึงทำให้สามารถพบแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแกรมลบในตัวอย่างไผ่ปลาทุหมักซึ่งเป็นอาหารหมักที่มีปริมาณ

เกลือสูง สอดคล้องกับการรายงานในตัวอย่างปลาว่า ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มได้ 40 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จำนวน 36 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ (Chancharoonpong and Palagool, 2020)

จากนั้นนำแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้ 130 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธี agar well diffusion บนอาหาร Skim milk agar พบว่ามีแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้จำนวน 24 ไอโซเลท คิดเป็น 18.46% โดยมีขนาดวงใสของการย่อยระหว่าง 10.53 - 21.36 มิลลิเมตร ซึ่งไอโซเลท E1-4 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด แสดงดังตารางที่ 2 และรูปที่ 1 และเมื่อนำแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้ง 24 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween 20 agar พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยมีการสร้างตะกอนขุ่นขาวขนาด 10.67 - 17.27 มิลลิเมตร ซึ่งมีจำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง โดยมีขนาดของตะกอนขุ่นขาวมากกว่า 15 มิลลิเมตร ได้แก่ E1-4 มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 17.27 ± 0.54 มิลลิเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับไอโซเลทอื่น รองลงมาคือ A3-10 (16.43 ± 0.55 มิลลิเมตร) E2-5 (16.09 ± 0.01 มิลลิเมตร) A1-2 (15.43 ± 1.16 มิลลิเมตร) และ A1-8 (15.37 ± 1.09 มิลลิเมตร) ดังแสดงดังตารางที่ 2 และรูปที่ 1

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างไตปลาหมึกมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกลิ่น รส ที่เฉพาะของไตปลาหมึก เนื่องจากวัตถุดิบหลักในกระบวนการหมักคือ เครื่องในของปลาหมึกซึ่งมีโปรตีนและไขมันเป็นองค์ประกอบ สอดคล้องกับการรายงานการพบแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสหรือไลเปสในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำปลาที่ผลิตจากโรงงานในภาคตะวันออกของประเทศไทย สามารถแยกแบคทีเรียชอบเค็มได้จำนวน 285 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 34 ไอโซเลท คิดเป็น 11.93% (Kanlayakrit and Bovornreungroj, 2005) ในขณะที่น้ำปลาของประเทศไทยสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงถึง 50% (20 ไอโซเลท) จากแบคทีเรียชอบเค็มทั้งหมด 40 ไอโซเลท (Samad *et al.*, 2017) อีกทั้งยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้จากปลาร้าของจังหวัดกรุงเทพมหานคร นนทบุรี พะเยา เชียงราย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร และประเทศลาวได้อีกด้วย (อำพรธนะและคณะ, 2558; Chancharoonpong and Palagool, 2020) และมีการรายงานการพบแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากปลาร้าของจังหวัดมหาสารคาม และน้ำปลาของจังหวัดสมุทรสาคร (Yiamsombut *et al.*, 2022) นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้จากบูดูของจังหวัดปัตตานีจำนวน 4 ไอโซเลท จากแบคทีเรียชอบเค็มทั้งหมด 47 ไอโซเลท คิดเป็น 8.51% (Kanjana and Sakpetch, 2020)

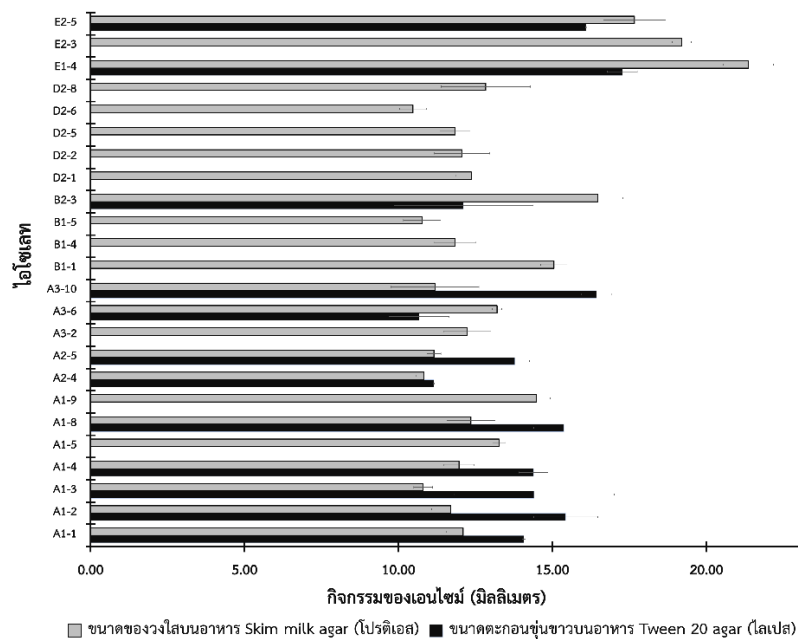
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของแบคทีเรียชอบเค็มที่เลือกได้จากตัวอย่างไต้ปลาหมึก

ไอโซเลท	gram staining	รูปร่าง	ขนาดของวงใสบนอาหาร Skim milk agar (มิลลิเมตร)	ขนาดตะกอนขุนขาวบนอาหาร Tween 20 agar (มิลลิเมตร)
A1-1	+	แท่งยาว	12.10 ± 0.60	14.07 ± 0.06 ^{bcd}
A1-2	+	กลม	11.70 ± 0.70	15.43 ± 1.16 ^{abc}
A1-3	+	กลม	10.80 ± 0.34	14.40 ± 2.91 ^{bcd}
A1-4	+	แท่งสั้น	11.96 ± 0.55	14.38 ± 0.53 ^{bcd}
A1-5	+	แท่งสั้น	13.33 ± 0.30	ND
A1-8	+	กลม	12.33 ± 0.90	15.37 ± 1.09 ^{abc}
A1-9	+	แท่งสั้น	14.46 ± 0.50	ND
A2-4	+	แท่งสั้น	10.83 ± 0.28	11.14 ± 0.02 ^e
A2-5	-	กลม	10.80 ± 0.34	13.78 ± 0.52 ^{cd}
A3-2	+	กลม	12.23 ± 0.86	ND
A3-6	+	กลม	13.20 ± 0.17	10.67 ± 1.09 ^e
A3-10	+	กลม	11.16 ± 1.60	16.43 ± 0.55 ^{ab}
B1-1	+	แท่งสั้น	15.05 ± 0.47	ND
B1-4	+	แท่งสั้น	11.83 ± 0.76	ND
B1-5	+	แท่งสั้น	10.76 ± 0.68	ND
B2-3	+	แท่งสั้น	16.46 ± 0.92	12.11 ± 2.52 ^{de}
D2-1	+	แท่งสั้น	12.36 ± 0.55	ND
D2-2	+	แท่งสั้น	12.06 ± 1.03	ND
D2-5	+	แท่งสั้น	11.83 ± 0.55	ND
D2-6	+	แท่งสั้น	10.53 ± 0.41	ND
D2-8	+	แท่งสั้น	12.83 ± 1.61	ND
E1-4	+	แท่งสั้น	21.36 ± 0.90	17.27 ± 0.54 ^a
E2-3	+	แท่งสั้น	19.20 ± 0.34	ND
E2-5	+	กลม	17.66 ± 1.13	16.09 ± 0.01 ^{abc}

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ND ย่อมาจาก Not detected คือ การตรวจไม่พบกิจกรรม

ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างชนิดกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



รูปที่ 1 ความสามารถของแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างไต้ปลาหมึกในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ด้วยวิธี agar well diffusion บนอาหาร Skim milk agar (□) และ Tween 20 agar (■) ตามลำดับ

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการนำแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้และพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลต ประกอบด้วย A1-2 A1-8 A3-10 E1-4 และ E2-5 มาจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA ความยาว 1079 1057 1003 1000 และ 1042 คู่เบส ตามลำดับ ไปเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank แสดงผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นค่า % similarity (สูงกว่า 98%) ในตารางที่ 3 โดยพบว่า ไอโซเลต E1-4 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงที่สุด มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Bacillus safensis* NBRC 100820 ในขณะที่ไอโซเลต A1-2 A1-8 A3-10 และ E2-5 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Staphylococcus epidermidis* NBRC 100911

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. safensis* และ *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างไต้ปลาหมึกที่วางจำหน่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน ซึ่งการพบ *S. epidermidis* เป็นจำนวนมากในตัวอย่างไต้ปลาหมึกอาจเกิดการปนเปื้อนจากมนุษย์ เนื่องจาก *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม coagulase negative staphylococci (CNS) ที่สามารถพบได้ทั่วไปบริเวณร่างกายของมนุษย์ (Heo et al., 2020) โดยในขั้นตอนของการเตรียมเครื่องในปลาซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการหมัก ต้องใช้มือของมนุษย์ในการดึงและแยกส่วนของเครื่องในออกจากตัวปลา จึงเป็นไปได้ว่า *S. epidermidis* ที่พบในตัวอย่างไต้ปลาหมึกอาจมีการปนเปื้อนมาจากมนุษย์ในขั้นตอนของการเตรียมวัตถุดิบ สอดคล้องกับการรายงานของปิยะวรรณ (2522) ที่กล่าวว่า สามารถตรวจพบ *S. epidermidis* ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้เป็นจำนวนมากในวันที่ 3 - 6 ของการหมักไต้ปลา ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายของเครื่องในปลาในช่วงแรกของการหมักเกิดจากเอนไซม์ที่อยู่ในกระเพาะและลำไส้ของปลา จากนั้นกระบวนการย่อยจะเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีการรายงานการพบ *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* และ *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียชอบเค็มและสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากตัวอย่างไต้ปลาหมึกของจังหวัดนครศรีธรรมราชได้อีกด้วย (Daroonpun et al., 2018)

สำหรับ *B. safensis* พบว่าไม่เคยมีการรายงานการตรวจพบในตัวอย่างไ้ปลาหมึกมาก่อน แต่มีการรายงานการพบจากเครื่องในของปลาซาร์ดินอินเดีย (Saidumohamed *et al.*, 2021) และตัวอย่างอาหารหมักชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วหมัก (Agbobatinkpo *et al.*, 2013) และกระหล่ำปลีดอง (Pan *et al.*, 2024) เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงเป็นครั้งแรกที่สามารถคัดเลือกไอโซเลท E1-4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้จากตัวอย่างไ้ปลาหมึก และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *B. safensis* NBRC 100820 สอดคล้องกับการรายงานของ Lateef *et al.* (2015) และ Zhang *et al.* (2024) ที่รายงานว่า *B. safensis* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น โปรติเอส ไลเปส อะไมเลส เซลลูเลส โคติเนส อินูลิเนส เคอราติเนส และเบต้ากาแลคโตซิเตส เป็นต้น อีกทั้งยังมีการรายงานถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ของ *B. safensis* เช่น ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโอซิน (Saidumohamed *et al.*, 2021; Kamilari *et al.*, 2025) ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Abdelli *et al.*, 2019) ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช (Rong *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2023) เป็นต้น ตลอดจนยังมีการรายงานถึงความปลอดภัยของ *B. safensis* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *B. safensis* FB03 ซึ่งพบยีนดื้อยาปฏิชีวนะเพียง 2 ชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ (Boby *et al.*, 2025) และ *B. safensis* APC 4099 ที่ไม่พบยีนเกี่ยวข้องกับ virulence factors ที่มีในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบเพียงยีน *bslA* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยในการสร้างไบโอฟิล์ม (Kamilari *et al.*, 2025)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบสายพันธุ์ของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากตัวอย่างไ้ปลาหมึกกับฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank

ไอโซเลท	สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใกล้เคียง	Accesssion number	% similarity
A1-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911	NR_113957	98.90
A1-8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911	NR_113957	98.51
A3-10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911	NR_113957	98.42
E1-4	<i>Bacillus safensis</i> NBRC 100820	NR_113945	98.11
E2-5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911	NR_113957	98.48

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีของตัวอย่างไ้ปลาหมึกที่วางจำหน่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย พบว่ามีความคุณภาพทางเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง โดยมีค่า pH ระหว่าง 4.70 - 5.80 มีปริมาณกรดแลคติก 3.40 - 4.60% และมีปริมาณเกลือในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.00% จนถึง 22.44% แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการผลิตของผู้ผลิตแต่ละราย และเมื่อทำศึกษาแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากตัวอย่างไ้ปลาหมึก พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มได้จำนวน 130 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 24 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้ 12 ไอโซเลท โดยไอโซเลท E1-4 เป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้สูงที่สุด เมื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *B. safensis* NBRC 100820 ซึ่งมีการรายงานถึงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ ของ *B. safensis* จำนวนมาก จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำไอโซเลท E1-4 ไปศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่อื่น ๆ เพิ่มเติม เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเอนไซม์ต่อไป อย่างไรก็ตามยังไม่มีเคยมีการรายงานการพบ *B. safensis* ในตัวอย่างไ้ปลาหมึกมาก่อน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองจึงควรทำการศึกษาตัวอย่างไ้ปลาหมึกเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

- ปิยะวรรณ กาสลัก. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชา 305411 เทคโนโลยีอาหารหมักดอง. นครราชสีมา: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 69.
- ลัญจกร จันทรอุดม และมณฑกานต์ ทองสม. (2561). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตฮีสตามีนและการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช. วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช 37(1): 12 - 24.
- อำพรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์, ชนิตา ชูพรหม และอายุริน มานะ. (2558). การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากปลาร้า. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม 10(1): 1 - 8.
- อุษณีย์ อภิบาลแบ, สมพร ประเสริฐสงสกุล, อภิชัย บัวชูก้าน และสมรักษ์ พันธุ์ผล. (2556). การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูงและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. ใน: การประชุมมหาดไทยวิชาการ ครั้งที่ 4 วันที่ 10 พฤษภาคม 2556. มหาวิทยาลัยมหาดไทย, สงขลา. 32 - 39.
- Abdelli, F., Jardak, M., Elloumi, J., Stien, D., Cherif, S., Mnif, S. and Aifa, S. (2019). Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin (s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. Biodegradation 30: 287 - 300.
- Agbobatinkpo, P.B., Thorsen, L., Nielsen, D.S., Azokpota, P., Akissoe, N., Hounhouigan, J.D. and Jakobsen, M. (2013). Biodiversity of aerobic endospore-forming bacterial species occurring in Yanyanku and Ikipuru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. International Journal of Food Microbiology 163(2-3): 231 - 238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro. 2013.02.008.
- AOAC. (2000). Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 17th edition. Virginia: The Association of Official Analysis Chemists.
- Boby, F., Bhuiyana, D.M.N.H., Khanb, D.M.S. and Parvez, M.M. (2025). Draft genome sequence data on *Bacillus safensis* FB03 isolated from the rhizosphere soil of leguminous plant in Bangladesh. Data in Brief 60: 111527. doi: 10.1016/j.dib.2025.111527.
- Chancharoonpong, C. and Palagool, N. (2020). Screening of halophilic bacteria and product characteristic from salty-fermented fish (Pla-ra). Science and Technology RMUTT Journal 10(1): 269 - 276.
- Daroonpant, R., Tanaka, N., Uchino, M. and Tanasupawat, S. (2018). Characterization and Screening of Lipolytic Bacteria from Thai Fermented Fish. Sains Malaysiana 47(1): 91 - 97. doi: 10.17576/jsm-2018-4701-11.
- Heo, S., Lee, J.H. and Jeong, D.W. (2020). Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods. Food Science and Biotechnology 29(8): 1023 - 1035. doi: 10.1007/s10068-020-00789-5.
- Kamilar, E., O'Connor, P.M., Farias, F.M.D., Johnson, C.N., Buttmer, C., Deliephan, A., Hill, D., Fursenko, O., Wiese, J., Stanton, C., Hill, C. and Ross, R.P. (2025). *Bacillus safensis* APC 4099 has broad-spectrum antimicrobial activity against both bacteria and fungi and produces several antimicrobial peptides, including the novel circular bacteriocin safencin E. Applied and Environmental Microbiology 91(1): e01942-24. doi: 10.1128/aem.01942-24.

- Kanjan, P., and Hongpattaraere, T. (2016). Antibacterial metabolites secreted under glucose-limited environment of the mimicked proximal colon model by lactobacilli abundant in infant feces. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(17): 7651 - 7664. doi: 10.1007/s00253-016-7606-5
- Kanjan, P. and Sakpetch, P. (2020). Functional and safety assessment of *Staphylococcus simulans* PMRS35 with high lipase activity isolated from high salt-fermented fish (Budu) for starter development. *LWT - Food Science and Technology* 24: 109183. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109183.
- Kanlayakrit, W. and Bovornreungroj, P. (2005). Isolation and characterization of salt-loving protease producing bacteria from fish sauce samples. *Kasetsart Journal Natural Science* 39: 88 - 97.
- Kumar, A., Dhiman, S., Krishan, B. Samtiya, M., Kumari, A., Pathak, N., Kumari, A., Aluko, R. and Dhewa, T. (2024). Microbial enzymes and major applications in the food industry: a concise review. *Food Production, Processing and Nutrition* 6: 85. doi: 10.1186/s43014-024-00261-5.
- Lateef, A., Adelere, I.A. and Gueguim-Kana, E.B. (2015). The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia* 70(4): 411 - 419. doi: 10.1515/biolog-2015-0062.
- Margesin, R., and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5(2): 73 - 83. doi: 10.1007/s007920100184.
- Pan, T. Li, M., Guo, J., Zhao, D., Liu, X., Huang, H., Wang, N., Yu, S., Guan, J., Liu, M., Zhang, S., Wang, C. and Yang, G. (2024). *Bacillus safensis* from sauerkraut alleviates acute lung injury induced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* through the regulation of M2 macrophage polarization via its metabolite esculin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 73(1): 409 - 424. doi: 10.1021/acs.jafc.4c05508.
- Rong, S., Xu, H., Li, L., Chen, R., Gao, X. and Xu, Z. (2020). Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 162: 69 - 77. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.09.003.
- Saidumohamed, B.E., Baburaj, A.P., Johny, T.K., Sheela, U.B., Sreeranganathan, M. and Bhat, S.G. (2021). A magainin-2 like bacteriocin BpSL14 with anticancer action from fish gut *Bacillus safensis* SDG14. *Analytical Biochemistry* 627: 114261. doi: 10.1016/j.ab.2021.114261.
- Saimmai, A. Chooklin, C. S., Chingjit, S., Rattana, N., Maneerat, S., Hwanhlem, N., Saisa-ard, K. and Dikit, P. (2017). Monitoring the lactic acid bacterial diversity during Budu fermentation by culturing method and PCR-DGGE technique. In: The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand. 52 - 61.
- Samad, N.S., Amid, A., Jimat, D.N. and Shukor, N.A.A. (2017). Isolation and identification of halophilic bacteria producing halotolerant protease. *Science Heritage Journal* 1(1): 7 - 9. doi: 10.26480/gws.01.2017.07.09.
- Sekar, A. and Kim, K. (2020). Halophilic bacteria in the food industry. In: *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, S.K. Kim (Ed.). pp. 2061. doi: 10.1002/9781119143802.ch91.

- Silhavy, T.J., Kahne, D. and Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2(5): a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., and Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(2): 504 - 544. doi: 10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998.
- Vijayaraghavan, P. and Vincent, S.G.P. (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. Journal of Biochemical Technology 4(3): 628 - 630.
- Yiamsombut, S., Kuncharoen, N., Techo, S., Chamroensaksri, N. and Tanasupawat, S. (2022). Characterization and lipolytic activity of *Staphylococcus* strains isolated from Thai Fermented Fish Products. Journal of Fisheries and Environment 46(2): 88 - 99.
- Zhang, X., Zhang, D., Yan, Y., Wang, R., Chi, Y., Zhang, D., Zhou, P. and Chu, S. (2024). Enhancing aerobic composting performance of high-salt oily food waste with *Bacillus safensis* YM1 . Bioresource Technology 397: 130475. doi.10.1016/j.biortech.2024.130475.
- Zhu, X.C., Xu, S.G., Wang, Y.R., Zou, M.T., Mridha, M.A.U., Javed, K. and Wang, Y. (2023). Unveiling the Potential of *Bacillus safensis* Y246 for Enhanced Suppression of *Rhizoctonia solani*. Journal of Fungi 9(11): 1085. doi: 10.3390/jof9111085.

