การผลิตไส้กรอกอีสานเสริมแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอสิด(กาบา)โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus plantarum* SKKL1

Production of Sai Krok Esan Supplement with Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Using Pure Culture of *Lactobacillus plantarum* SKKL1

Watchareeya Wonghan (วัชรียา วงษ์หาญ)* Dr.Kanit Vichitphan (ดร.คณิต วิชิตพันธุ์)**,***

Sukanda Vichitphan (สุกานดา วิชิตพันธุ์)**,***

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอสิด(กาบา)สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* SKKL1 ซึ่งผลิตสารกาบาในปริมาณสูงในอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 16.30 กรัมต่อลิตร นำมาใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตไส้กรอกอีสาน การทดลองแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 เติมเชื้อบริสุทธิ์ 10^6 เซลล์ต่อกรัมไส้กรอก และชุดการทดลองที่ 3 เติมเชื้อบริสุทธิ์ 10^8 เซลล์ต่อกรัมไส้กรอก ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณกาบาสูงสุด 5,756 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไส้กรอก ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสพบว่า ไส้กรอกอีสานชุดการทดลองที่ 2 ได้คะแนนการยอมรับความชอบโดยรวมและความชอบต่อรสเปรี้ยวของไส้กรอกมากกว่าไส้กรอกอีสานชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ABSTRACT

Lactobacillus plantarum SKKL1 which produced high GABA concentration (16.30 $g.L^{-1}$) was used as starter culture for Sai Krok Esan production. Sai Krok Esan production was designed into 3 groups which groups 1, 2 and 3 were control, added starter culture 10^6 cell/g sausage and added starter culture 10^8 cell/g sausage, respectively. The result showed that the amount of GABA production from *L. plantarum* SKKL1 inoculated Sai Krok Esan 10^6 CFU/g sausage exhibited highest GABA production which was 5,756 mg/kg sausage. Sensory evaluations of GABA Sai Krok Esan used 10^6 CFU/g sausage were higher acceptable than the control as a significant difference ($p>0.05$).

คำสำคัญ: แกมมาอะมิโนบิวทีริกแอสิด ไส้กรอกอีสาน แบคทีเรียกรดแลคติก

Key Words: Gamma-aminobutyric acid, Sai Krok Esan, Lactic acid bacteria

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

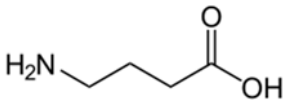
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

**** ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

ไส้กรอกอีสาน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ทำจากเนื้อหมู มันหมู ข้าวสุก ปรุงรสด้วยเครื่องปรุงรส เครื่องเทศและสมุนไพร เช่น น้ำตาลทราย เกลือ กระเทียมบด พริกไทย ลูกผักชี ผสมให้เข้ากัน นวดจนเหนียว บรรจุในไส้หมูหรือไส้ชนิดอื่นที่บริโภคได้ มัดเป็นท่อน ผึ่งไว้ในที่สะอาดและแห้งจนเปรี้ยว และต้องทำให้สุกก่อนรับประทาน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2546) โดยในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากที่สุดคือแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างทั้งที่เป็นแท่งและกลม ไม่สร้างสปอร์ มีความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดสูง (Acid tolerance) และเจริญได้แม้สภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (งามนิจ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถเปลี่ยนสารกลูตาเมต (Glutamate) ให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแกมมาอะมิโนบิวไทริก (สารกาบา) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Cho et al., 2011)

กรดแกมมาอะมิโนบิวไทริก (Gamma aminobutyric acid: GABA) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_9NO_2$ (ดังภาพที่ 1) เป็นกรดอะมิโนประเภท non - protein พบมากในระบบประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cho et al., 2011) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง และยังเป็นสารสื่อประสาทประเภทยับยั้ง (Inhibitor) โดยทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมอง ช่วยให้สมองผ่อนคลายและนอนหลับสบายและทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (Anterior Pituitary) ผลิตฮอร์โมนช่วยในการเจริญเติบโต เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ (Kim and Kim, 2012)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (กาบา) (ดัดแปลงจาก Dhakal, 2012)

สารกาบา เป็นที่รู้จักกันมานานแล้วในหลายประเทศ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในอาหารหลายประเภท ทั้งในพืช ผัก ผลไม้ รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก เช่น เต้าหู้ กิมจิ (Cho et al., 2011; Kim and Kim, 2012) ดังตารางที่ 1 รวมถึงแหนม (Ratanaburee et al., 2013a; Ratanaburee et al., 2013b) ไส้กรอกหมัก เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สารกาบาในธรรมชาติมีปริมาณไม่คงที่ และอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะทำให้เกิดผลตามที่ผู้บริโภคคาดหวังได้ ดังนั้นจึงมีการเติมกาบาลงในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับในปริมาณที่เพียงพอ (กาญจนา, 2555)

ตารางที่ 1 ปริมาณค่ากาบาที่พบในอาหารประเภทต่างๆ (ดัดแปลงจาก กาญจนา, 2555)

ชื่ออาหาร	ปริมาณสารกาบา (mg/100g)
ใบชาแห้ง	100-200
แตงเมลอน	74.5
มะเขือเทศ	62.6
กิมจิ	59.4
ช็อกโกแล็ต	14.5
ข้าวกล้องงอก	10.0
ฟักทอง	9.7
เต้าหู	6.4

ในปัจจุบันมีการพัฒนาสารกาบา เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ โยเกิร์ต ลูกอม

หมากฝรั่ง ไส้กรอก ขนมปัง ชีส นมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม หรือกาแฟพร้อมดื่ม รวมไปถึงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดเม็ด (กาญจนา, 2555) โดยการใช้สารกาบาเติมลงไปโดยตรง แต่ในกรณีผลิตภัณฑ์อาหารหมักนั้น มีรายงานวิจัยหลายฉบับ ที่ใช้แบคทีเรียที่สามารถผลิตกาบาได้ เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิต (Cho et al., 2011; Kim and Kim, 2012; Ratanaburee et al., 2011; Park and Oh, 2007) เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์สารกาบาระหว่างกระบวนการหมักทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เสริมกาบาที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค

วัตถุประสงค์งานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติผลิตสารกาบา จากตัวอย่างอาหารหมัก และเพื่อศึกษาการเจริญและสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ในการผลิตสารกาบา เพื่อใช้เตรียมเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตไส้กรอกอีสานสุขภาพโดยเติมแบคทีเรียกรดแลค ติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม

วิธีการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานและผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองมาคัดแยก โดยชั่งตัวอย่าง 20 กรัม เติมลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 180 มิลลิลิตร บดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง ทำ serial dilution โดยเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-8} เท่า เลือกสารละลายตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 10^{-4} – 10^{-8} เท่า spread ลงบนอาหาร MRS agar (ที่ผสม 1% $CaCO_3$) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่มีบริเวณใส(Clear zone) และสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่ต่างกัน (ดัดแปลงจากวิธีของวัทธิกร, 2551) เพื่อนำมาย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) และตรวจสอบคะตะเลส (Catalase test) รายละเอียดมีดังนี้

การย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) นำโคโลนีของแบคทีเรียผลิตกรด มาสังเกตการณ์ติดสีแกรมและดูรูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์ (ดัดแปลงจากงามนิจ, 2537) จากนั้นนำโคโลนีมาทดสอบแคตาเลส (Catalase test) โดยหยดด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอออกไซด์ 3 % 1-2 หยด หากเกิดฟองอากาศขึ้นแสดงว่า การทดสอบให้ผลเป็นบวก (Catalase positive) ถ้าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบ (Catalase negative) นำเซลล์ที่ให้ผลเป็นลบไปศึกษาต่อไป (วัทธิกร, 2551)

นำโคโลนีที่สร้างโซนใสที่ให้ผลการติดสีเป็นบวก และทดสอบแคตาเลสให้ผลเป็นลบ มาทำการเก็บรักษาใน 50 % glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบความสามารถในการผลิตแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิด (กาบา)

เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปรับปริมาณเริ่มต้นของเซลล์เท่ากันแล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ผสม 5% Monosodium glutamate (MSG) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ติดตามการผลิตกาบาทุกๆวันเป็นเวลา 5 วัน (ดัดแปลงวิธีจาก Kim and Kim, 2012) ตรวจสอบกาบาที่ผลิตได้ด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC) โดยนำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น silica โดยใช้ MSG และสารกาบามาตรฐานเปรียบเทียบ จากนั้นใช้สารละลายผสม [(1-butanol: acetic acid: distilled water (3:2:1)] ในการแยกสารกาบา และพ่นทับแผ่น silica ด้วย 0.5% ninhydrin และอบด้วยความร้อน 10 นาที สังเกตตำแหน่งสีที่ปรากฏ (ดัดแปลงจากวิธีของ Thwe et al., 2011)

การศึกษาการเจริญและการผลิตสารกาบาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว MRS ที่ผสม 5% MSG บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก โดยมีรายละเอียดดังนี้

การวัดค่าความขุ่นของเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว MRS บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ปิเปตน้ำหมัก 1 มิลลิลิตรทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นปิเปตอาหารเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl และวัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีชีวิต (Total plate count) ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างน้ำหมัก ด้วย 0.85% NaCl ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ 10^{-1}-10^{-8} เท่า จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MRS agar (1.0 % $CaCO_3$) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดบริเวณใส รายงานผลเป็นโคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิต (Cho et al., 2011)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยนำน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นแยกส่วนใสออกจากตะกอนเซลล์ และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

วัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ตามวิธีของ AOAC (2000) โดยปิเปตน้ำหมักใส่ฟลาสก์รูปชมพู่ จำนวน 3 ขวดปริมาตรขวดละ 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรทุกขวด จากนั้น หยดสารละลาย 1% phenolphthalein 2-3 หยด นำสารละลายที่เตรียมได้มาไทเตรตกับสารละลาย 0.1 N NaOH จนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน) บันทึกปริมาตรสารละลาย 0.1 N NaOH ที่ใช้ไป คำนวณหาปริมาณกรดโดยใช้มวลโมเลกุลของกรดแลคติกในการคำนวน

วัดปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทีริก แอสิด แบ่งออกเป็น 2 วิธีดังนี้ การวิเคราะห์แกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิดด้วยวิธี TLC ดัดแปลงจากวิธีของ Thwe et al. (2011) และการหาปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) เตรียมตัวอย่างน้ำหมัก โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ได้สารละลายส่วนใสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ใช้คอลัมน์ Inertsil® ODS-3 (4.6 x 250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครลิตร) วิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโท-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Shimadzu รุ่น LC-20A binary pump, column oven (40 องศาเซลเซียส) รุ่น CTO-20A และ RF detector รุ่น RF-10A จากนั้นเตรียมสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย สารละลาย A และสารละลาย Reagent OPA กำหนดอัตราเร็วของสารละลายเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ตรวจวัดสารกาบาที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารกาบามาตรฐานและกรดกลูตามิกมาตรฐาน กำหนดความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4, และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Rattanaburee et al., 2011)

การผลิตไส้กรอกอีสานโดยเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

เตรียมเนื้อหมูบดที่ผสมเครื่องเทศ นำมาแบ่งออกเป็น 3 ส่วน 3 ชุดการทดลอง โดย *ชุดการทดลองที่ 1* กำหนดให้เป็นชุดการทดลองควบคุม ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ *ชุดการทดลองที่ 2* เติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* SKKL 1 โดยกำหนดให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1x 10^6 เซลล์ต่อกรัมของตัวอย่าง *ชุดการทดลองที่ 3* เติมแบคทีเรียผลิตกรด แลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum*

SKKL1 กำหนดให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1x 10^8 เซลล์ต่อกรัมของตัวอย่าง

เมื่อเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกแล้ว ทำการผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นบรรจุส่วนผสมทั้งหมดลงในไส้หมูล้างสะอาด ใช้เชือกมัดแบ่งเป็นข้อและตากไส้กรอกอีสานในที่มีลมผ่านสะดวกเพื่อเริ่มกระบวนการหมัก โดยการหมักเริ่มต้นนับจากวันที่ผลิตไส้กรอกอีสานเป็นต้นไป ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวันมาวิเคราะห์ ทางกายภาพ ทางเคมีและทางจุลชีววิทยาต่อไป

การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี ทางจุลชีววิทยาและ การประเมินความชอบและการยอมรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างไส้กรอกอีสานเป็นเวลา 4 วัน โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ทางกายภาพ สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และลักษณะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน ในระยะเวลา 4 วัน

การวิเคราะห์ทางเคมี โดยตรวจติดตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดปริมาณกรดทั้งหมด (total tritratable acidity) และวัดปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทีริก แอซิด (กาบา) ในระยะเวลา 4 วันโดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง ทำการสุ่มตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 10 กรัม จาก 3 จุด เติมน้ำกลั่นแล้วกรองเพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ติดตามค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Thwe et al., 2011) การวัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) (AOAC, 2000) การทดสอบปริมาณกรดทั้งหมดจากไส้กรอกอีสานโดยวิธีไทเตรต ทำโดยสุ่มตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 10 กรัม จาก 3 จุด จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับการวัดค่าความเป็นกรดด่างในน้ำหมักและการวัดปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิด โดยเตรียมน้ำสกัดจากตัวอย่างไส้กรอก (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Rattanaburee et al., 2013b) โดยนำตัวอย่างไส้กรอกอีสานผสมกับ 4% acetic acid (อัตราส่วน 1:4 w/v) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสและนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาด้วยวิธี TLC และ HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารกาบาในน้ำหมัก

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา วิเคราะห์โดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ผลิตกรดและการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ดังนี้ การนับจำนวนจุลินทรีย์ผลิตกรด โดยชั่งตัวอย่าง 20 กรัม เติมลงใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ต้องการ เช่นเดียวกับขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ผลิตกรด ในน้ำหมัก และการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยชั่งตัวอย่าง 20 กรัม เติมลงใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ 10^{-1}-10^{-8} เท่า จากนั้นปิเปตแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงบน plate แล้วเทอาหาร Plate count agar (PCA) ที่หลอมเหลว ปริมาณ 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารเย็น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร รายงานผลเป็นโคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร(วัทธิกร, 2551)

การประเมินความชอบและการยอมรับผลิตภัณฑ์

ทำการประเมินความชอบและการยอมรับผลิตภัณฑ์โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation) (ไพโรจน์, 2545) โดยคัดเลือกผู้บริโภคที่รับประทานผลิตภัณฑ์ไส้กรอก จำนวน 30 คน โดยทำการประเมินความชอบโดยรวม ความชอบต่อสี ลักษณะเนื้อสัมผัส และรสเปรี้ยว โดยให้คะแนนแบบ hedonic จำนวน 9 ระดับ โดยระดับความชอบ 1 หมายถึง ไม่ชอบมาก จนถึง 9 หมายถึง ชอบมาก ผลคะแนนความชอบของผู้บริโภคถูกนำมาวิเคราะห์ความ

แปรปรวน (ANOVA) ใช้โปรแกรม SPSS Version 12.0 เพื่อประเมินความชอบที่มีต่อตัวอย่างไส้กรอกอีสาน เปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Rang Test ประเมินที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานและอาหารหมัก

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดจากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานและหม่ำ จำนวน 13 ตัวอย่าง จากร้านค้าที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานและหม่ำที่มีชื่อเสียงในจังหวัดขอนแก่นมีดังนี้

ร้านค้าที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน ได้แก่ เฮงง่วนเฮียง แหนมลับแล เจ๊รัช เจ้อิม และแหนมปริญญา ร้านค้าที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์หม่ำเนื้อและหม่ำหมู ได้แก่ ครัวแม่คำพอง ครัวอีสาน คำหล้า 2 กุ๊กมีลาบก้อย

โดยนำผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานและหม่ำจากร้านค้าดังกล่าว มาคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดพบว่า ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานสามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดทั้งหมด 71 ไอโซเลท และผลิตภัณฑ์หม่ำสามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดทั้งหมด 26 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียผลิตกรดแลค ติกที่คัดแยกได้นั้น ได้นำไปทดสอบขั้นตอนต่อไป

จากผลการแยกเบื้องต้นพบจุลินทรีย์ที่เกิดโซนใสบนอาหาร MRS ที่มี 1% $CaCO_3$ ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ในกรณีตัวอย่างไส้กรอกอีสานจำนวน 71 ไอโซเลท ตัวอย่างหม่ำจำนวน 26 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกัน ไปย้อมสีแกรมและทดสอบแคตาเลส เพื่อทดสอบจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้น ผลการทดสอบพบว่า จำนวนไอโซเลททั้งหมดติดสีแกรมบวกและการทดสอบแคตาเลสให้ผลเป็นลบ (ไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น) ผลการตรวจสอบการผลิตสารกาบาด้วยวิธี TLC พบว่ามีแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 21 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสารกาบาได้ จึงเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตสารกาบาได้ในปริมาณสูง เพื่อนำไปบ่งชี้สายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป

การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

จากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้งหมด 21 ไอโซเลท ที่มีความสามารถผลิตสารกาบาได้ คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารกาบาในปริมาณสูง จำนวน 14 ไอโซเลท เพื่อนำมาบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ด้วยวิธีการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16s rRNA (Kim and Kim, 2012) ผลการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (แสดงดังตารางที่ 2) พบว่าทั้ง 14 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 4 กลุ่มได้แก่ *L. plantarum* 10 ไอโซเลท *L. pentosus* 2 ไอโซเลท *P. pentosaceus* 1 ไอโซเลท และ *W. cibaria* 1 ไอโซเลท ซึ่ง *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มหลักที่พบในอาหารประเภทเนื้อหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Callewaert et al. (2000) ทำการศึกษาแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก พบว่ามี *L. curvatus*, *L. plantarum* และ *L. sakei* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มหลักที่มีในวัตถุดิบตั้งต้นและพบแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ตลอดระยะการหมัก 28 วัน ส่วน *P. pentosaceus* เป็นกลุ่มรองที่เจริญตามมา

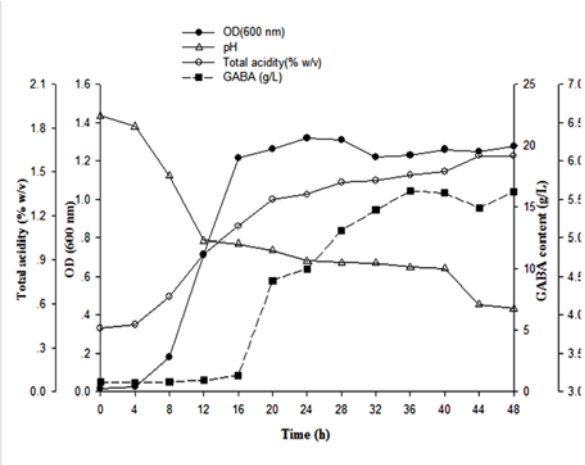
ตารางที่ 2 ผลการบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

กลุ่ม	ชื่อสายพันธุ์	ชื่อไอโซเลท
1.	*L. plantarum*	SSNH28, SKKE2,SKKP1, SKKP5, SKKL1, SKN2, SKN5, SKN13, NBK5, NBK10
2.	*L. pentosus*	SKKE3, SKKP2
3.	*P. pentosaceus*	SFM1
4.	*Weissella cibaria*	SFM5

จากผลการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดแลค ติกในเบื้องต้นได้เลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและผลิตสารกาบาในปริมาณสูง แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ที่มีความปลอดภัย คือ *L. plantarum* SKKL1 โดยนำแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกมาศึกษาการเจริญในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาการเจริญและการผลิตสารกาบาของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบา คือ *L. plantarum* SKKL1 ผลการทดลองพบว่า ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หลังจากนั้นมีการเพิ่มจำนวนขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 มีค่าความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มลดลงในระหว่างการเจริญเมื่อระยะการหมักเพิ่มขึ้น โดยมีค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4.1 และปริมาณกรดทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดสุดท้ายประมาณ 1.61% และจากการวัดปริมาณสารกาบาพบว่า มีปริมาณสารกาบา 16.3 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 2

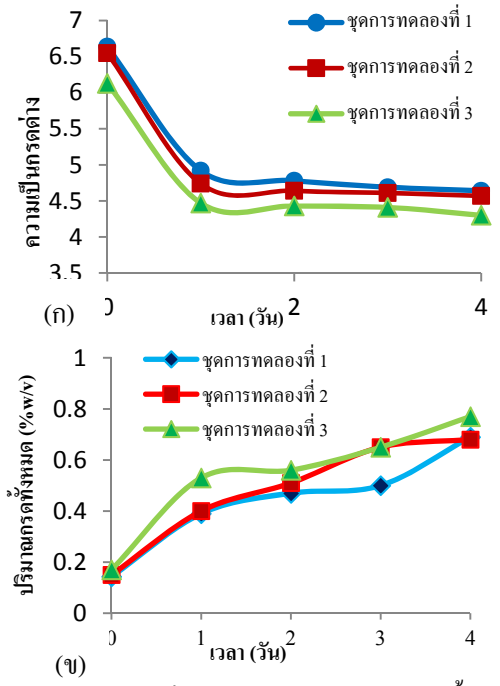


ภาพที่ 2 กราฟการเจริญและการเปลี่ยนแปลงกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมดของแบคทีเรียผลิตกรดแลค ติก สายพันธุ์ *L. plantarum* SKKL1 ในอาหารเหลว MRS ที่มี 5% MSG

การผลิตไส้กรอกอีสานโดยเติมแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

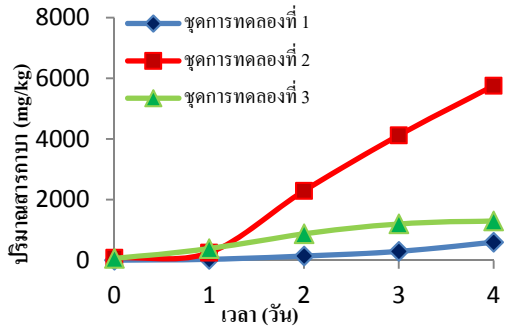
จากกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสาน ได้เติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่คัดแยกได้ คือ *L. plantarum* SKKL1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชั่วโมงที่ 16 โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นปริมาณ $1x10^6$ และ $1x10^8$ เซลล์ต่อกรัมไส้กรอก ลงในเนื้อหมูบดที่ผ่านกระบวนการเตรียมจากร้านค้าแล้ว โดยผสมให้เข้ากับเนื้อหมู จากนั้นนำไปบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง จากนั้นเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่หมักเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน นำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และจุลชีววิทยา ส่วนการประเมินทางประสาทสัมผัสใช้ไส้กรอกอีสานที่หมักเป็นระยะเวลา 2 วัน เนื่องจากการรับประทานไส้กรอกอีสานนิยมรับประทานในวันที่ 1-2 ของการหมัก (ประดิษฐ์ และคณะ, 2555) โดยผลการทดลอง ดังนี้

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่างแสดงในภาพที่ 3 (ก) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของตัวอย่างไส้กรอกอีสานทั้ง 3 สภาวะการทดลอง มีค่าลดลงจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 1 อย่างชัดเจน และมีค่าลดลงเล็กน้อยหลังจากวันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 แนวโน้มที่ลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง โดยค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของไส้กรอกทั้ง 3 ชุดการทดลอง เท่ากับ 4.7, 4.6 และ 4.3 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างไส้กรอกอีสานในระหว่างการหมักมีค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างไส้กรอกอีสาน แสดงดังภาพที่ 3 (ข) ซึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 ของการหมักตามลำดับ



ภาพที่ 3 ค่าความเป็นกรดด่าง (ก) ปริมาณกรดทั้งหมด (ข) ของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่หมักเป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

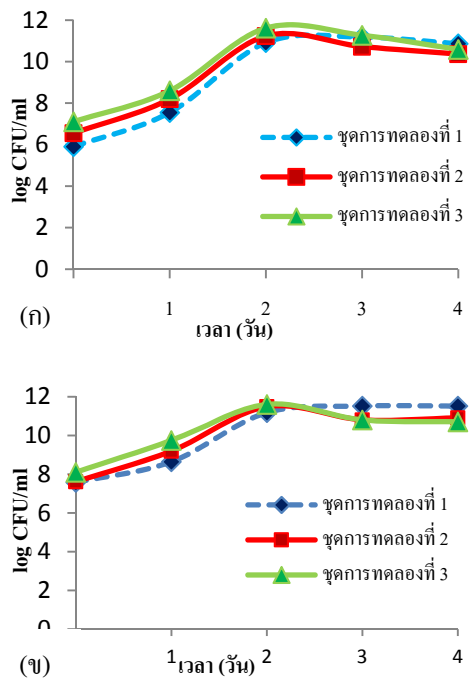
การวัดปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทีริก แอซิดจากการหาปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิดหรือสารกาบา ในสารละลายไส้กรอกอีสาน 3 ชุดการทดลอง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าไส้กรอกอีสานทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีปริมาณสารกาบาสูงสุดประมาณ 579, 5,756 และ 1,299 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมไส้กรอก ตามลำดับ (ดังภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ปริมาณสารกาบาที่วิเคราะห์จากตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 3 ชุดการทดลอง ที่หมักเป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ซึ่งชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณสารกาบาสูงกว่าชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Ratanaburee et al. (2013b) ทำการผลิตแหนมที่เติมเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *L. namurensis* NH2 และ *P. pentosaceus* HN8 โดยทำการกำหนดปริมาณเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น 10^6-10^8 เซลล์ต่อกรัมตัวอย่าง พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อกรัมตัวอย่าง มีปริมาณกาบาสูงสุด (4,051 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง)

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา แบ่งออกเป็นการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ผลิตกรด พบว่าจำนวนแบคทีเรียผลิตกรดชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดมากกว่าชุดควบคุมในวันที่ 0 และทุกชุดการทดลองมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงวันที่ 2 และหลังจากวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ของการหมักมีจำนวนเพิ่มขึ้นที่ลดลง แสดงดังภาพที่ 5 (ก) และภาพที่ 5 (ข)



ภาพที่ 5 จำนวนจุลินทรีย์ผลิตกรด (ก) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (ข) ที่ตรวจนับได้ในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 3 ชุดการทดลองที่หมักเป็นเวลา 0, 2 และ 4 วัน

การประเมินความชอบและการยอมรับผลิตภัณฑ์

เพื่อต้องการทราบการยอมรับในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานหลังจากการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จึงทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยมีการเปรียบเทียบข้อมูลการทดสอบทางประสาทสัมผัสระหว่างตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานที่ได้จากการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกดังกล่าว และผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานทางการค้าที่วางจำหน่ายในร้านที่มีชื่อเสียงของจังหวัดขอนแก่น ซึ่งเชิญผู้ทดสอบชิมทั้งหมด 30 คน ที่บริโภคผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน มาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คะแนนความชอบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสเฉลี่ยของไส้กรอกอีสาน

ตัวอย่าง	ลักษณะทางประสาทสัมผัส			
	ความชอบโดยรวม	ความชอบต่อสี	ความชอบต่อเนื้อสัมผัส	ความชอบต่อรสเปรี้ยว
ชุดการทดลองที่1	6.67±1.18^{ab}	6.30±1.70^{ns}	6.37±1.45^{ns}	6.37±1.47^{b}
ชุดการทดลองที่ 2	7.10±1.44^{b}	6.90±1.32^{ns}	6.97±1.45^{ns}	7.30±1.44^{c}
ชุดการทดลองที่ 3	6.37±1.67^{ab}	6.67±1.24^{ns}	6.17±1.44^{ns}	5.17±1.88^{a}
ไส้กรอกทางการค้า	6.17±1.44^{a}	6.27±1.31^{ns}	6.27±1.48^{ns}	6.30±1.75^{b}

หมายเหตุ 1) Mean ± Standard deviation

2) ในแถวเดียวกัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($\alpha \leq 0.05$)

3) ns หมายถึง คะแนนเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($\alpha \leq 0.05$)

จากผลการทดสอบความชอบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส ด้านความชอบโดยรวม พบว่าคะแนนความชอบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานชุดการทดลองที่ 2 มีคะแนนเฉลี่ยสูงสุด (7.10) และไส้กรอกอีสานทางการค้า มีคะแนนเฉลี่ยต่ำสุด (6.17) เป็นคะแนนเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ด้านความชอบต่อสีและความชอบด้านเนื้อสัมผัส พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกอีสานมีคะแนนเฉลี่ยไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ด้านความชอบต่อรสเปรี้ยว พบว่าไส้กรอกอีสานชุดการทดลองที่ 2 มีคะแนนเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 7.30 และไส้กรอกอีสานชุดการทดลองที่ 3 มีคะแนนเฉลี่ยต่ำที่สุดคือ 5.17 เป็นคะแนนเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความชอบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสในด้านต่างๆ ไส้กรอกอีสานชุดการทดลองที่ 2 มีการยอมรับจากผู้บริโภคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานสูงกว่าไส้กรอกอีสานทุกชุดการทดลองและมีการยอมรับสูงกว่าไส้กรอกอีสานทางการค้า ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกาบา ในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน วันที่ 2 ของการหมัก พบว่า ไส้กรอกอีสาน ชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณสารกาบาสูงกว่าทุกชุดการทดลอง จากการทดสอบจึงทำให้ทราบว่า การเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ มีเซลล์เริ่มต้น $1x10^6$ เซลล์ต่อกรัมไส้กรอก มีผลให้คุณลักษณะของไส้กรอกอีสานดีที่สุด

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตไส้กรอกอีสาน โดยใช้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานและหม่ำ ที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น ผลการทดลองสรุปได้ว่าสามารถแยกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารกาบากาได้ 21 ไอโซเลทและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารกาบาปริมาณสูงทั้งหมด 14 ไอโซเลท นำมาบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา จากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก คือ *L.*

plantarum SKKL1 ที่สามารถผลิตสารกาบาปริมาณสูง ใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตไส้กรอกอีสาน พบว่าผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานที่เติมเชื้อเริ่มต้น $1x10^6$ เซลล์ต่อกรัมของตัวอย่าง มีปริมาณกาบาสูงที่สุด และทางประสาทสัมผัสได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคด้านรสเปรี้ยวและความชอบโดยรวมสูงที่สุดโดยเปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานควบคุม ซึ่งผลงานวิจัยการผลิตไส้กรอกอีสานใช้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตไส้กรอกอีสานเพื่อสุขภาพในเชิงการค้าต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (National Research Council of Thailand) และศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา พลอยศรี. 2555. GABA กับการผ่อนคลายความเครียด.จดหมายข่าว ชา, ปีที่ 2 (8): 8-10.

งามนิจ นนทโส. 2537. หนังสือประกอบการเรียนการสอนวิชา Systematic bacteriology. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

งามนิจ นนทโส. 2539. การศึกษาชนิด ปริมาณแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักมั่ม. รายงานวิจัยทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี, ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประดิษฐ์ คำหนองไผ่, สุภาพร ร่มโพธิ์ไทร, จิระเดช มณีรัตน์. 2555. แนวทางใหม่ในการลดปริมาณมันหมูแข็งในไส้กรอกเปรี้ยว. รายงานผลงานวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ คณะเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. การประเมินทางประสาทสัมผัส. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วัทธิกร นาถประนิล. 2551. การใช้แบคทีเรียแลคติกที่แยกและจำแนกจากส้มฟักเพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร], ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน: ไส้กรอกอีสาน มผช. 144/2546. กระทรวงอุตสาหกรรม.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of Chemical AOAC INTERNATIONALVolume 2, AOAC international.

Callewaert, R., Hugas, M. and De Vuyst, L. (2000), Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production Spanish-style dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology.,57:33-42.

Cho, S.Y., Park, M.J., Kim, K.M., Ryu, J.H. and Park, H.J. (2011), "Production of high γ-aminobutyric acid (GABA) sour kimchi using lactic acid bacteria isolated from Mukeunjee kimchi", The Food Science and Biotechnology, Vol. 20, pp. 403–408.

Dhakal, R., Bajpai, K.V., Baek K.H. (2012). Production of GABA (γ– aminobutyric acid) by micro-organisms: a review. Brazilian Journal of Microbiology, 1230-1241.

Kim, M.J. and Kim, K.S. (2012), "Isolation and Identification of γ-aminobutyric acid (GABA)-producing Lactic Acid Bacteria from Kimchi", The official journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry, Vol. 55, pp. 777-785.

Park, K.B. and Oh, S.H. (2007), "Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract", Bioresource Technology, Vol. 98, pp. 1675-1679.

Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Penjamras, P. and Chaiyasut, C. (2011), "Enhancement of γ-aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12", Electronic Journal of Biotechnology (ISSN: 0717-3458), Vol. 14 (3). http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue3-fulltext-2http://www.Ejbiotechnology.info).

Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W. and Sukhoom, A. (2013a), "Selection of γ-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics for use as starter cultures in Thai fermented sausages (Nham)", The International Journal of Food Science and Technology, Vol. 48, pp. 1371-1382.

Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W. and Sukhoom, A. (2013b), "Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8", International Journal of Food Microbiology, Vol. 167, pp. 170-176.

Thwe, S.M., Kobayashi, T., Luan, T., Shirai, T., Onodera, M., Hamada-Sato, N. and Imada, C. (2011), "Isolation, characterization, and utilization of gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice", Fisheries Science, Vol. 77, pp. 279–288.