การเพิ่มปริมาณกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (กาบา) ในแหนมเห็ดโดยการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพสูง

Increasing of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Content in Fermented Mushroom (Nham-Hed) by Using High Potential Lactic Acid Bacteria as a Starter

เพ็ญพร มีเงินลาด[1], วิชัย เสริมผล[2], จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี[3] และ วราวุธ ธนะมูล[4*]
Phenphorn Meengoenlad[1], Wichai Soemphol[2], Jirawan Oonmettaaree[3] and Varavut Tanamool[4*]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
[2]ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
[4]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*
[1]Science Education Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University
[2]Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products – FerVAAP, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University
[3]Food science and Technology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University
[4]Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University*

Received : 29 April 2020
Revised : 8 June 2020
Accepted : 23 June 2020

บทคัดย่อ

กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (กาบา) เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ใช่โปรตีนทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งที่สำคัญในระบบประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตกาบาโดยใช้กรดกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตกาบาในกระบวนการหมักแหนมเห็ด โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* L10-11 ที่มีศักยภาพในการผลิตกาบา ในอาหาร MRS แล้วนำกล้าเชื้อไปทำแห้ง ด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สำหรับการผลิตแหนมเห็ดจะใช้กล้าเชื้อผงของแบคทีเรีย *L. plantarum* L10-11 ที่ได้ ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ผสมกับเกลือแกงร้อยละ 2.0 ข้าวหุงสุกร้อยละ 20 และโมโนโซเดียมกลูตาเมตร้อยละ 3.0 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใช้สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตแหนมเห็ดที่มีปริมาณกาบาสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ประมาณ 72 เท่า รวมทั้งสามารถผลิตกาบาได้มากกว่าแหนมเห็ดจากท้องตลาดด้วย ดังนั้นการใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* L10-11 เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตแหนมเห็ดนั้นประสบผลสำเร็จในการใช้เพื่อเพิ่มปริมาณกาบาในผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดได้

คำสำคัญ : แหนมเห็ด ; กาบา ; จุลินทรีย์กรดแลคติก ; อาหารหมัก

Abstract

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid, serves as a major inhibitory neurotransmitter in mammalian nervous systems. Various lactic acid bacteria can produce GABA by using glutamic acid as a substrate. Hence, the ability of lactic acid bacterial starter cultures to produce gamma-aminobutyric acid (GABA) during mushroom fermentation was investigated. The selected potential GABA-producing *Lactobacillus plantarum* L10-11 was cultured in MRS medium and dried by freezing dryer. The dried *L. plantarum* L10-11 powder was used as a starter for fermented mushroom (Nham-Hed) production. In this study 0.2% (w/w) of bacterial starter powder was mixed with 2.0% (w/w) of NaCl 20% (w/w) of cooked rice and 3.0% (w/w) of MSG and incubated at 35°C for 120 h, respectively. The results indicated that using this condition can produce the higher GABA content than the control sample approximately 72 times and also offered the higher GABA content than that of commercial Nham-Hed products. This study demonstrated that starter powder of *L. plantarum* L10-11 was successfully used in Nham-Hed in order to improve GABA content.

Keywords : Nham-Hed ; GABA ; lactic acid bacteria ; fermented food

*Corresponding author. E-mail : Varavut12@gmail.com

บทนำ

จังหวัดนครราชสีมามีพื้นที่ขนาดใหญ่และเป็นแหล่งเกษตรกรรม สามารถผลิตสินค้าทางการเกษตรและนำมาแปรรูปเป็นผลิตผลทางการเกษตรเพื่อจำหน่าย โดยเฉพาะเขตอำเภอปากช่องและอำเภอวังน้ำเขียว ซึ่งเป็นแหล่งท่องเที่ยวและเป็นแหล่งผลิตผลผลิตด้านเกษตรกรรมที่หลากหลาย เช่น ผลไม้และพืชผักต่างๆ โดยเฉพาะเห็ดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเห็ด จากรายงานของกรมส่งเสริมการเกษตรปี 2559 ปริมาณผลผลิตเห็ดนางรมในจังหวัดนครราชสีมาที่เก็บเกี่ยวได้มีจำนวน 12,224 กิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณสูงเป็นลำดับที่ 11 ของประเทศ (Department of Agricultural Extension, 2016) ซึ่งบางส่วนนำมาแปรรูปเป็นแหนมเห็ด โดยที่ผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดยังเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตจำหน่ายตลอดทั้งปีเนื่องจากเห็ดสามารถออกดอกได้ทุกฤดูกาล โดยสามารถผลิตได้จากเห็ดที่เหลือจากการขาย หรือเห็ดที่มีลักษณะ รูปร่างที่ไม่สวยงาม ไม่เหมาะแก่การนำมาขายในรูปแบบเห็ดสด การนำมาแปรรูปจึงเป็นแนวทางที่สามารถเพิ่มมูลค่าของเห็ดที่เหลือได้ ซึ่งผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดนั้นได้รับการตอบรับที่ดีจากนักท่องเที่ยว เนื่องจากผู้บริโภคสามารถรับประทานได้ทันที อีกทั้งมีข้อดีคือสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ไม่รับประทานเนื้อสัตว์ได้ นอกจากสารอาหารที่ได้จากเห็ดแล้ว ผู้ผลิตยังมีการเพิ่มคุณค่าโดยการเติมข้าวกล้องงอกเข้าไปในกระบวนการผลิตเพื่อเสริมกาบา (GABA) ให้แก่แหนมเห็ด เป็นแนวทางที่สามารถเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งกาบาหรือกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (Gamma-aminobutyric acid, GABA) เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง โดยทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองส่งผลให้สมองเกิดการผ่อนคลาย (Cho *et al.*, 2011) ช่วยกระตุ้นการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Interior pituitary) ที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (Human growth hormone, HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการกระชับ บรรเทาอาการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในวัยทอง เช่น นอนไม่หลับ ซึมเศร้าและระบบประสาทอัตโนมัติผิดปกติได้ (Kim & Kim, 2012) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณกาบาที่มีในข้าวกล้องงอกนั้นมีปริมาณน้อยและสามารถเสื่อมสลายได้ง่ายในสภาวะที่เป็นกรดที่เกิดจากการหมัก การเพิ่มคุณค่าโดยการเพิ่มปริมาณกาบาให้แก่แหนมเห็ดจึงเป็นแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคและผู้จำหน่าย ซึ่งพบว่าในอาหารหมักที่มี การทำงานของแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus brevis, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus paracasei* และ *Lactobacillus plantarum* สามารถผลิตกาบาในระหว่างกระบวนการหมักได้ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าการใช้แบคทีเรีย *L. plantarum* L10-11 ที่ได้จากการคัดแยกจากปลาส้ม (Tanamool et al., 2019) ในการผลิตส้มผักหรือผักดอง ประสบผลสำเร็จในการเพิ่มปริมาณกาบาให้แก่ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตกาบา

ดังนั้นงานวิจัยนี้ถือว่าเป็นครั้งแรกที่มีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการผลิตกาบาในปริมาณสูงสำหรับผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด โดยใช้ *L. plantarum* L10-11 มาใช้ในการผลิตแหนมเห็ดนางรมเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณกาบาให้สูงขึ้น โดยใช้เป็นกล้าเชื้อผงเพื่อให้ง่ายต่อการผลิตแหนมเห็ดของเกษตรกรและผู้สนใจ รวมทั้งเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดให้เป็นแหล่งอาหารทางเลือกที่มีคุณประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การเพาะเลี้ยงและการเตรียมกล้าเชื้อผงของแบคทีเรียกรดแลคติก L. plantarum L10-11

นำแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* L10-11 ขีดลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS (De Man Rogosa and Sharpe) ชนิดแข็ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในหลอดทดลองที่มี

อาหารเหลว MRS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเกลี่ยเชื้อลงในอาหาร MRS ชนิดแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Thirumurugan *et al.*, 2019) ถ่ายแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk เข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร นำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer) โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง กำหนดค่าอุณหภูมิเป็น -70 องศาเซลเซียส ความดัน 1×10^{-3} mbar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Gasaluck & Isaranuvat, 2015) เมื่อได้กล้าเชื้อผงนำไปศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของ *L. plantarum* L10-11 โดยวัดการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติก ตรวจนับปริมาณ *L. plantarum* L10-11 ด้วยวิธี dilution plating โดยใช้ 3M Petrifilm^{TM} Aerobic count plate ซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปใช้สำหรับตรวจนับจำนวนแอโรบิคแบคทีเรีย (AOAC Official method 990.12) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์ในหน่วยซีเอฟยูต่อกรัมเชื้อผง (CFU/g)

2. การเตรียมตัวอย่าง

การผลิตแหนมเห็ดในการวิจัยครั้งนี้ ใช้เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer) ที่เหลือจากการจำหน่ายของเกษตรกรเนื่องจากมีรูปร่างลักษณะที่ไม่สวยงาม ไม่เหมาะแก่การนำมาขายในรูปแบบเห็ดสด จากตลาดย่าโม ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา โดยนำมาทำความสะอาดและฉีกตามแนวยาวเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง นำไปนึ่งที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็น จากนั้นบีบน้ำออกจนความชื้นของเห็ดเหลือประมาณร้อยละ 35-40 จะได้เห็ดนางรมนึ่งเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตแหนมเห็ดต่อไป

3. การผลิตแหนมเห็ด

การผลิตแหนมเห็ดใช้สูตรแหนมเห็ดที่ได้จากการดัดแปลงจากสูตรในวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Agricultural product, 2008) มีส่วนประกอบหลักที่สำคัญคือ เห็ดนางรมนึ่งสุก กระเทียมโขลก เกลือ และข้าวหอมดอกมะลิทุ่งสัมฤทธิ์หุงสุก โดยแปรปัจจัยในการผลิตแหนมเห็ดคือ การเติมกล้าเชื้อผง *L. plantarum* L10-11 และโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ผสมโดยใช้สูตรดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที ชั่งส่วนผสมปริมาณ 10 กรัม บรรจุลงในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน ขนาด 6x10 เซนติเมตร ปิดปากถุงและมัดด้วยยางพลาสติกในลักษณะเป็นตุ้มทรงสามเหลี่ยม บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างสำหรับนำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณกาบาที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ เปรียบเทียบกับแหนมเห็ดที่มีขายในท้องตลาด 3 ยี่ห้อ โดยเก็บตัวอย่างจากอำเภอปากช่องและอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา

ตารางที่ 1 สูตรแหนมเห็ดที่ใช้ในการทดลอง

สูตร	**เห็ดนางรมนึ่งสุก** (g)	**ปริมาณกล้าเชื้อ** %(w/w)*	**ปริมาณ** NaCl %(w/w)*	**ปริมาณ** MSG %(w/w)*	**ปริมาณข้าวหุงสุก** %(w/w)*	**กระเทียม** %(w/w)*
Control	100	-	2.50	-	20	10
S1**	100	-	2.50	3.00	20	10
S2**	100	0.20	2.50	-	20	10
S3**	100	0.20	2.50	3.00	20	10

หมายเหตุ : * คือ ร้อยละน้ำหนักโดยมวลต่อน้ำหนักของเห็ดนางรมนึ่งสุก

** S1 (ไม่เติมกล้าเชื้อแต่เติม MSG), S2 (เติมกล้าเชื้อแต่ไม่เติม MSG) และ S3 เติมกล้าเชื้อและเติม MSG)

4. วิธีการวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ดัดแปลงจากวิธีการของ Sanchart *et al.* (2017) โดยชั่งตัวอย่างแหนมเห็ด 10 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนแล้วกวนด้วยเครื่องกวนสารให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที วัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter (Mettler Toledo, SevenEasy™)

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (2000) โดยชั่งตัวอย่างแหนมเห็ด 10 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 6359 g เป็นเวลา 1 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman no.4) นำส่วนของเหลวที่กรองได้มาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน นำผลที่ได้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sae-teng & Laohakunjit (2018) ชั่งตัวอย่างแหนมเห็ด 10 กรัม มาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI water) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 30:1)เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปแยกส่วนใสกับตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 6000xg เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Hitachi, Chromaster) ชนิดคอลัมน์ Vertisep™ GES C18 (300x4.6x5 µm) ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KH_2PO_4 /H_3PO_4) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 2.55 และอะซิโตรไนไตรล์ (Acetronitrile) ในอัตราส่วน 95:5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดการดูดกลืนแสงแบบหลายความยาวคลื่น (Photodiode array detector) ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณกาบา ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Panrod *et al.* (2016) ชั่งตัวอย่างแหนมเห็ด 10 กรัม เติมเมทานอล (Methanol) และน้ำกลั่นในอัตราส่วน ความเข้มข้น 1 ต่อ1 และ สารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนพทาดีไฮด์ (2–hydroxynaphthaldehyde) ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร ที่เตรียมในเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Borate buffer ค่าความเป็นกรดด่าง

8 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และสารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนพทาดีไฮด์ ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงและเก็บในที่มืด ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีสมรรถนะสูง (Hitachi, Chromaster) โดยใช้คอลัมน์ Vertisep™ GES C18 (300x4.6x5 µm) ใช้เฟสเคลื่อนที่เมทานอล และน้ำปราศจากไอออน (DI water) อัตราส่วน 66:34 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบหลายความยาวคลื่น (Photodiode array detector) ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร

4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยนำข้อมูลปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิก ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณกาบา มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แหนมเห็ดจากท้องตลาด จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ver. 13

ผลการวิจัย

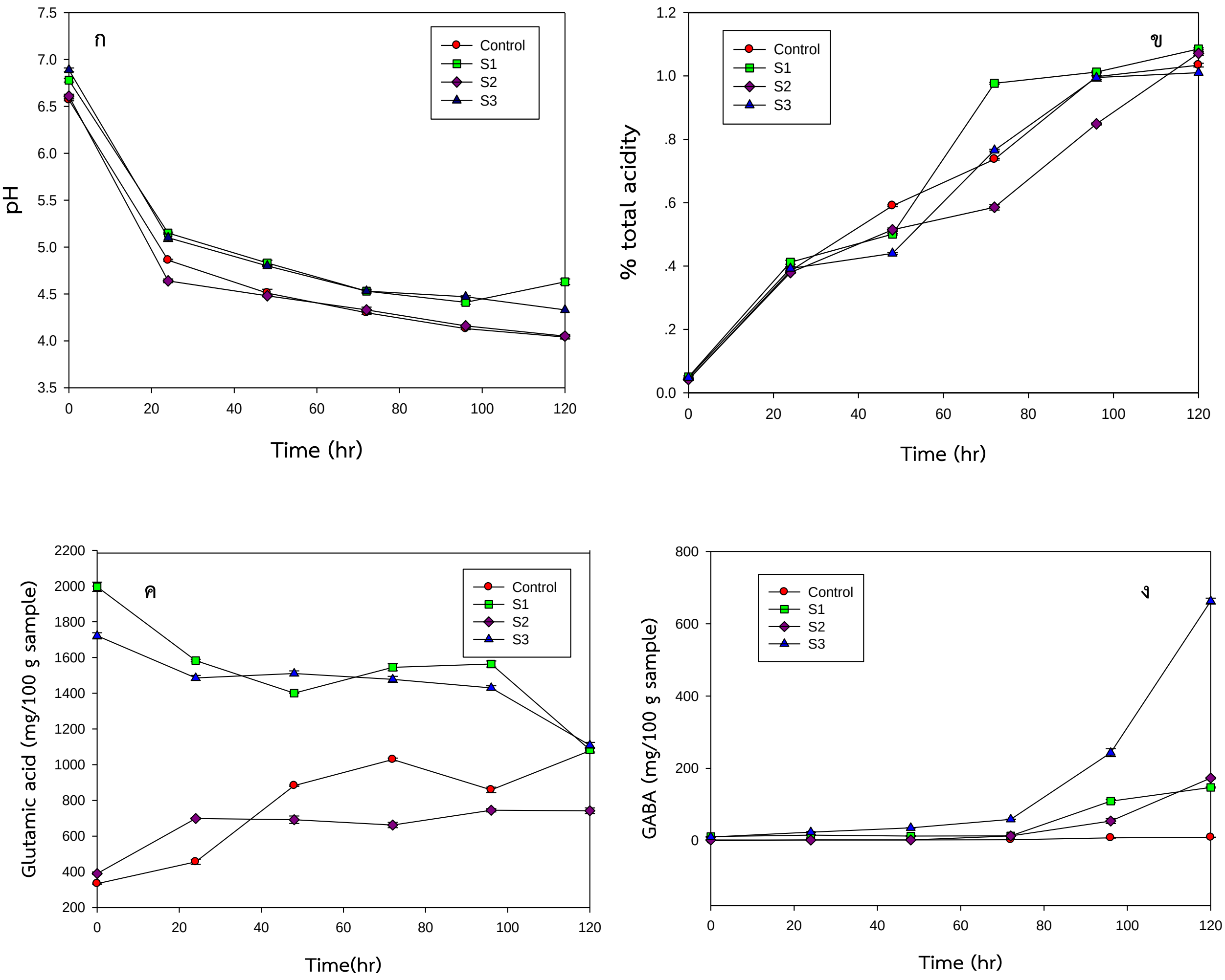
<u>*1. การเพาะเลี้ยงและการเตรียมกล้าเชื้อผงของแบคทีเรียกรดแลคติก L. plantarum* L10-11</u>

กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* L10-11 ที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze Dryer เก็บรักษาในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์แบบสุญญากาศเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางชีวภาพ ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน แสดงดังภาพที่ 1 ตรวจสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* L10-11 ในกล้าเชื้อผง พบว่า มีจำนวนเท่ากับ 8.30×10^{16} ซีเอฟยูต่อกรัมตัวอย่างกล้าเชื้อ ซึ่งปริมาณของแบคทีเรียที่นับจำนวนได้มีความสามารถในการอยู่รอดสูงและเพียงพอต่อการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียผงสำหรับการผลิตแหนมเห็ดในขั้นตอนต่อไปได้

ภาพที่ 1 กล้าเชื้อผงที่ได้จากการทำแห้งแบบ Freeze Dryer

2. การผลิตแหนมเห็ดด้วยกล้าเชื้อผง L. plantarum L10-11

จากการทดลองในการผลิตแหนมเห็ดโดยใช้สูตรดังตารางที่ 1 แหนมเห็ดทั้ง 4 สูตรการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างในเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองพบว่า ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณกาบา แสดงดังภาพที่ 2 ก-ง



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิค และปริมาณกาบาในตัวอย่างแหนมเห็ดที่ผลิตทั้ง 4 การทดลอง ในแต่ละชั่วโมงของการหมัก (คือตัวอย่าง Control คือ S1(ไม่เติมกล้าเชื้อแต่เติม MSG) คือ S2 (เติมกล้าเชื้อแต่ไม่เติม MSG) และ คือ S3 (เติมกล้าเชื้อและเติม MSG) ตามลำดับ)

จากภาพที่ 2 (ก) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น (pH) ของตัวอย่างแหนมเห็ดทั้ง 4 สูตรการทดลอง มีค่าอยู่ในช่วง 6.6 – 6.8 เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมงค่าความเป็นกรดด่างจะมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 120 โดยค่าความเป็นกรดด่างเมื่อผ่านการหมัก 120 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 4.04 (Control), 4.63 (S1), 4.05 (S2) และ 4.33 (S3) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างแหนมเห็ด แสดงดังภาพที่ 2 (ข) ปริมาณกรดทั้งหมดของทั้ง 4 สูตรการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 1.03 (Control), 1.09 (S1), 1.07 (S2) และ 1.01 (S3) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดกลูตามิกในตัวอย่างแหนมเห็ดทั้ง 4 สูตรการทดลอง ตัวอย่าง S1 (เติม MSG แต่ไม่เติมกล้าเชื้อผง) และ S3 (เติม MSG และเติมกล้าเชื้อผง) พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกรดกลูตามิกจะมีปริมาณลดลง กรณีของปริมาณกาบา ในตัวอย่างที่ได้ในแหนมเห็ดทั้ง 4 สูตรการทดลอง พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นแหนมเห็ด สูตร S1, S2 และ S3 มีปริมาณกาบาเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น โดยตัวอย่างสูตร S3 มีปริมาณกาบาสูงสุดเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 120 ชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณาตัวอย่างควบคุม ซึ่งไม่มีการเติม MSG และกล้าเชื้อผง พบว่ากาบามีปริมาณเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของแหนมเห็ดที่ได้จากการทดลองนี้กับแหนมเห็ดที่มีขายตามท้องตลาด 3 ยี่ห้อ เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในเขตอำเภอปากช่องและอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา นำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณกาบา ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณกาบาของผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดที่ได้จากการทดลองและที่จำหน่ายตามท้องตลาดจำนวน 3 ยี่ห้อ

ผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด	pH	**ร้อยละปริมาณกรดทั้งหมด**	**ปริมาณกรดกลูตามิก** (mg/100 g sample)	**ปริมาณกาบา** (mg/100 g sample)
Control**	4.04±0.02^{b}	1.03±0.01^{d}	1,078.12±11.73^{d}	9.12±0.58^{a}
S1**	4.63±0.03^{e}	1.09±0.00^{g}	1,083.75±12.56^{df}	146.98±1.62^{c}
S2**	4.05±0.02^{b}	1.07±0.01^{f}	742.30±12.65^{b}	173.01±2.23^{d}
S3**	4.33±0.01^{c}	1.01±0.00^{c}	1,109.32±15.72^{f}	662.59±8.14^{e}
M1**	4.48±0.01^{d}	0.44±0.00^{a}	821.87±13.21^{c}	14.95±1.08^{b}
M2**	3.83±0.04^{a}	1.06±0.00^{e}	632.44±0.68^{a}	14.22±0.39^{b}
M3**	4.85±0.01^{f}	0.52±0.00^{b}	1,632.06±6.67^{g}	9.91±0.04^{a}

หมายเหตุ : *ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)
**การวิเคราะห์ตัวอย่าง Control (ไม่เติมกล้าเชื้อและไม่เติม MSG), S1 (ไม่เติมกล้าเชื้อแต่เติม MSG), S2 (เติมกล้าเชื้อแต่ไม่เติม MSG) และ S3 (เติมกล้าเชื้อและเติม MSG) และตัวอย่างที่จำหน่ายตามท้องตลาดจำนวน 3 ยี่ห้อ เมื่อบ่ม 120 ชั่วโมง

จากตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรดด่าง ร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณกาบาของตัวอย่างที่ได้จากการทดลองทั้ง 4 สูตรการทดลอง และตัวอย่างแหนมเห็ดที่จำหน่ายตามท้องตลาด M1-M3 พบว่าปริมาณกาบาในตัวอย่างแหนมเห็ดสูตร S3 (เติม MSG และเติมกล้าเชื้อผงของแบคทีเรีย *L. plantarum* L10-11) มีปริมาณกาบาสูงที่สุดคือ 662.59 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง รองลงมาคือแหนมเห็ดสูตร S2 (ไม่เติม MSG แต่เติมกล้าเชื้อผง) และแหนมเห็ดสูตร S1 (เติม MSG แต่ไม่เติมกล้าเชื้อผง) ตามลำดับ โดยมีค่ามากกว่าแหนมเห็ดสูตรควบคุม (Control) ส่วนแหนมเห็ดที่จำหน่ายตามท้องตลาดทั้ง 3 ยี่ห้อ มีปริมาณกาบาต่ำกว่าแหนมเห็ดสูตร S1-S3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การผลิตอาหารแบบดั้งเดิมนั้นจะใช้แบคทีเรียท้องถิ่นที่มีในวัตถุดิบ โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ในการถนอมอาหารได้ ในปัจจุบันเริ่มมีการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์ในกระบวนการผลิตอาหารหมักดองเนื่องจากง่ายต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังงานวิจัยของ Ratanaburee *et al.* (2013) ได้ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตแหนมหมูโดยกำหนดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Lactobacillus namurensis* NH2 และ *Pediococcus pentosaceus* HN8 ที่มีปริมาณเริ่มต้น 10^6 -10^{10} เซลล์ต่อกรัมตัวอย่าง และ Wonghan & Vichitphan (2011) ได้มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* SKKL1 ในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน โดยใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อกรัมตัวอย่าง สามารถผลิตกาบาสูงสุดถึง 4,051 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง จากผลการทดลองแหนมเห็ดสูตร Control และ S2 (ไม่เติม MSG แต่เติมกล้าเชื้อผง) มีค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายต่ำกว่าในตัวอย่าง S1 (เติม MSG แต่ไม่เติมกล้าเชื้อผง) และ S3 (เติม MSG และเติมกล้าเชื้อผง) ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างนั้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลกติกมีการผลิตกรดในระหว่างการเจริญเติบโต ดังรายงานการวิจัยของ Inchuy *et al.* (2011) ที่พบว่าแหนมโคที่ผลิตได้มีค่าความเป็นกรดด่างลดลงและปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อหมักเป็นเวลา 3 วัน โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 1.01 และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดทั้งหมดในแหนมเห็ดพบว่า ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อผง (S2) จะมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่าง Control (ไม่เติมกล้าเชื้อ) ซึ่งมีค่าไปในทิศทางเดียวกับ งานวิจัยของ Kantachote *et al*. (2016) ซึ่งมีการเติม *L. namurensis* NH2 หมักแหนมเนื้อโคและมีการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุดร้อยละ 0.857

กรณีการเติม MSG ในตัวอย่างแหนมเห็ด แบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการผลิตกรดในระหว่างการเจริญเติบโต ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด โดยปกติแล้วแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* จะมีกลไกที่ทำให้แบคทีเรียสามารถทนกรดได้โดยใช้กระบวนการ Glutamate decarboxylation ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยน กรดอะมิโนกลูตาเมต (Glutamate) ที่มีความเป็นกรดให้เป็นกาบาที่มีความเป็นกรดต่ำกว่า โดยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate decarboxylase (GAD) จะเป็นการลดความเป็นกรดในระบบได้ (Kerdsup & Kerdsup, 2018) ทำให้ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในตัวอย่าง S1 และ S3 มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติม MSG ในตัวอย่างที่ไม่มีการเติม MSG ลงในผลิตภัณฑ์ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกลูตามิกมีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากโครงสร้างของผนังเซลล์เห็ดนางรมที่ใช้เป็นวัตถุดิบถูกทำลายและปลดปล่อยกรดกลูตามิกที่เป็นกรดอะมิโนหลักในเห็ดออกมาได้ง่ายขึ้นในระหว่างการหมักโดยแบคทีเรีย ปริมาณ MSG และกล้าเชื้อผงที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดนั้น มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกาบาที่ผลิตได้ใน

ตัวอย่างแหนมเห็ด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kantachote *et al.* (2016) ที่มีการผลิตแหนมหมู โดยเติม MSG จำนวน 5 กรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ *L. namurensis* สามารถผลิตกาบาได้เท่ากับ 396.20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จในการนำกล้าเชื้อผงของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* L10-11 ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตกาบา มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมเห็ด โดยผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดที่มีการเติมกล้าเชื้อผงร้อยละ 0.2 กรัมตัวอย่างกับโมโนโซเดียมกลูตาเมตร้อยละ 3 หมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกาบาสูงที่สุดคือ 662.59 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม 72 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับแหนมเห็ดที่จำหน่ายตามท้องตลาดจำนวน 3 ยี่ห้อ พบว่าแหนมเห็ดที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อผง *L. plantarum* L10-11 มีปริมาณกาบาสูงกว่าแหนมเห็ดที่ขายตามท้องตลาดทั้ง 3 ยี่ห้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การผลิตแหนมเห็ดโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* L10-11 สามารถผลิตกาบาปริมาณสูง อีกทั้งเป็นแนวทางในการผลิตแหนมเห็ดเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเห็ดและคุณค่าทางอาหารในผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดอีกด้วย อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไปจำเป็นต้องศึกษาปริมาณสารตั้งต้นและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกาบา และต้องมีการปรับปรุงสูตรให้เหมาะสมแก่การบริโภค เพื่อให้ได้แหนมเห็ดที่มีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา และงบประมาณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

Agricultural product. (2008). *Thai agricultural standard*. National Bureau of Agricultural Commodity and Food standand. Retrieved January 20th, 2017, from http://www.acfs.go.th/agri_standards.php:2560. (in Thai)

AOAC. (2000). *AOAC Official methods of analysis (Association of Official Analytical Chemists, 17th ed)* .International Inc. Arlington Virginia, USA.

AOAC Official method 990.12. *Aerobic Plate Count in Foods, Dry Rehydratable Film*. International Inc. Arlington Virginia, USA.

Cho, S. Y., Park, M. J., Kim, K. M., Ryu, J. H., & 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, 20*, 403–408.

Department of agricultural extension. (2016). *Thai national AGRIS centre.* Retrieved June 14, 2020, from http://www.agriinfo.doae.go.th/

Gasaluck, P., & Isaranuvat, P. (2015). *Research Report*. Retrieved December 1, 2019, from http://sutir.sut.ac.th:8080/jspui/bitstream/123456789/5530/2/Fulltext.pdf

Inchuy, A., Pilassombut, K., Setakul, J., Limsupavanit, R., & Savetvivat, A. (2011). Use of probiotic starter culture (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and *Lactobacillus salivarius* D4) in beef Nham. *King Mongkut' s Agriculural Journal, 29*(3), 37-45. (in Thai)

Kantachote, D., Ratanaburee, A., & Sukhoom, A. (2016). Use of γ-aminobutyric acid producing lactic acid bacteria as starters to reduce biogenic amines and cholesterol in Thai fermented pork sausage (Nham) and their distribution during fermentation. *LWT- Food Science and Technology, 70*, 171-177.

Kerdsup, P., & Kerdsup, W. (2018). Effect of acidic adaptation on viability of *Lactobacillus casei* in acidic condition and model fruit juice. *Kasem Bundit Engineering Journal, 8*(3), 29-50. (in Thai)

Kim, M. J., & 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, 55*, 777-785.

Li, H., Qui, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories, 9*, 85.

Panrod, K., Tansirikongkol, A., & Punapisal, V. (2016). Comparison of validated high-perfomance liquid chromatography methods using two derivatizing agents for gamma-aminobutyric acid quantification. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 40*(4), 203-208.

Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., & 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, 167*, 170-176.

Sae-teng, A., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2018). Extraction of glutamic acid from tomato. *Agricultural Science Journal, 49*(2), 497-500. (in Thai)

Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., & Maneerat, S. (2017). *Lactobacillus futsaii* CS3, a new GABA-producing strain isolated from Thai fermented shrimp (*Kung-Som*). *Indian Journal of Microbiology, 57*, 211–217.

Tanamool, V., Hongsachart, P., & Soemphol, W. (2019). Screening and characterisation of gamma-aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish (Plaa-som) in Nong Khai and its application in Thai fermented vegetables (Som-pak). *Food Science and Technology*, Epub November 28, 2019 : https://doi.org/10.1590/fst.05419).

Thirumurugan, A., Sheela, R., & Singh, A. K. (2019). Growth profile and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ATM11 isolated from slaughterhouse soil. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 41*(1), 37-44.

Wonghan, W., & Vichitbhan, K. (2011). Production of Sai Krok Esan supplement with Gamma-aminobutyric acid (GABA) using pure culture of *Lactobacillus plantarum* SKKK1. *The National Graduate Research Conference, 34*, 654-664. (in Thai)