การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 6. ผลของโซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์ และ เชื้อ *Micrococcus varians* ต่อสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์

Nham Product Development Using Mixed Bacterial Starter Cultures 6. Effect of Sodium Nitrate and Sodium Nitrite and *Micrococcus varians* on Colour Development of Nham

ไพโรจน์ วิริยจารี[1/] *ลักขณา รุจนะไกรกานต์*[1/] *และ สุชาดา อนุตรกุล*[1/]

Pairote Wiriyacharee[1/]***, Lakkana Rujanakraikarn***[1/] ***and Suchada Anutarakun***[1/]

ABSTRACT : Nham colour development is very important for consumer acceptability. For this study, sodium nitrate and/or sodium nitrite were used together with/without nitrate reducing bacteria to investigate the colour development in Nham. It was found that the use of 500 ppm of sodium nitrate and 200 ppm of sodium nitrite with *Micrococcus varians* (10^3 cfu/g) in the formulation caused apparently the red pink colour development with higher rate and better than other samples. The colour developed from red yellow (5YR 8/2) to red pink (5R 7/4) after 24 hours of fermentation. The mean ideal ratio scores of colour and overall acceptability were

1/ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200.

1/ Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

1.02+0.02 and 0.95+0.04 respectively. The developed Nham was composed of pH (4.46-4.57) and total acidity as lactic acid (0.901-0.991%) after 48 hours of fermentation. There was also a very small amount of residual nitrite (21.84+0.10 ppm) in the product

บทคัดย่อ : ลักษณะสีที่ปรากฏของแหนมเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาสูตรการผลิตแหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมที่มีการใช้โซเดียมไนเตรท และ/หรือ โซเดียมไนไตรท์ ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมเชื้อแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ จากการทดลองพบว่าการใช้โซเดียมไนเตรท 500 ppm และ โซเดียมไนไตรท์ 200 ppm ร่วมกับเชื้อ *Micrococcus varians* (10^3 cfu/g) ในสูตรการผลิตจะทำให้สีชมพูแดงของผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเร็ว และดีกว่าตัวอย่างอื่นๆอย่างเห็นได้ชัดเจน กล่าวคือ สามารถพัฒนาสีจากสีเหลืองแดงออกน้ำตาลเนื้อ (5YR 8/2) เป็นค่าสีชมพูแดง (5R 7/4) หลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง อีกทั้งมีค่า mean ideal ratio scores ของ สีที่ปรากฏ และการยอมรับรวมเท่ากับ 1.02±0.02 และ 0.95±0.04 ตามลำดับ ในผลิตภัณฑ์แหนมที่พัฒนามีค่า pH (4.46-4.57) และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติค ร้อยละ 0.901-0.991 หลังจาก 48 ชั่วโมงของการหมัก อีกทั้งตรวจพบปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ค่อนข้างต่ำเช่นกันในผลิตภัณฑ์ (21.84±0.10 ppm)

Index words : แหนม การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนม Nham, Nham product development

คำนำ

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรเป็นอาหารหมักแบบพื้นบ้านที่ใช้ดินประสิว ซึ่งเป็นตัวให้สีในธรรมชาติแบบพื้นบ้าน ทำให้กลิ่นรสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัสแตกต่างกันไป เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดลักษณะดังกล่าวของแหนมมีหลายสายพันธุ์ ได้มีการใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมมาใช้ในกระบวนการผลิต (Wiriyacharee *et. al.* 1990) เพื่อปรับปรุงคุณภาพของแหนมให้มีความสม่ำเสมอ และปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมระหว่างเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติคได้ ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ในสูตรการผลิตแหนม และควบคุมสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดได้ประเภท *Lactobacillus planturum* จะมีผลต่อการลดลงของ pH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงแรกของการหมัก โดยการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดแลคติค เมื่อ pH ลดลงจะทำให้โปรตีนถูกทำลายไป มีการเกิดเจลขึ้นทำให้เนื้อเริ่มแข็งและเหนียวขึ้น และพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติคได้ประเภท *Pediococcus cerevisiae* มีผลต่อการเกิดความแน่นเนื้อ (firmness) ในช่วงหลังของการหมัก ซึ่งเชื้อดังกล่าวเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 (Buchanan and Gibbons, 1974) ดังนั้นสภาพสิ่งแวดล้อมของการหมักช่วงท้ายจึงเหมาะสมที่เชื้อดังกล่าวสามารถจะเจริญเติบโตและทำให้แหนมมีความเหนียวมากขึ้นด้วยเหตุนี้การใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* จึงมีผลทำให้เกิดความแน่นเนื้อของผลิตภัณฑ์แหนมได้

ส่วนเชื้อที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็น

ไนไตรท์ได้ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นนี้ คือ *Micrococcus varians* ซึ่งเชื้อดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ในช่วงแรกของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Deibel และคณะ (1961) ได้รายงานว่ากิจกรรมของเชื้อในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์เกิดในระหว่าง 2-16 ชั่วโมงแรกของการหมักไส้กรอกทั่วไป ขณะที่การสร้างกรดจะเริ่มขึ้นหลังจาก 8-16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า *Micrococcus varians* ควรจะมีกิจกรรมเกิดขึ้นก่อนที่จะถูกยับยั้ง เนื่องจากสภาพแวดล้อมเป็นกรดมากขึ้น เมื่อแหนมมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นไนไตรท์จะสลายตัวไปเป็นไนตริคออกไซด์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับรงควัตถุเนื้อไมโอโกลบิน ทำให้ได้สารประกอบที่เรียกว่าไนโตรโซไมโอโกลบินจึงเกิดเป็นสีชมพูแดงในแหนม ดังแสดงในภาพที่ 1

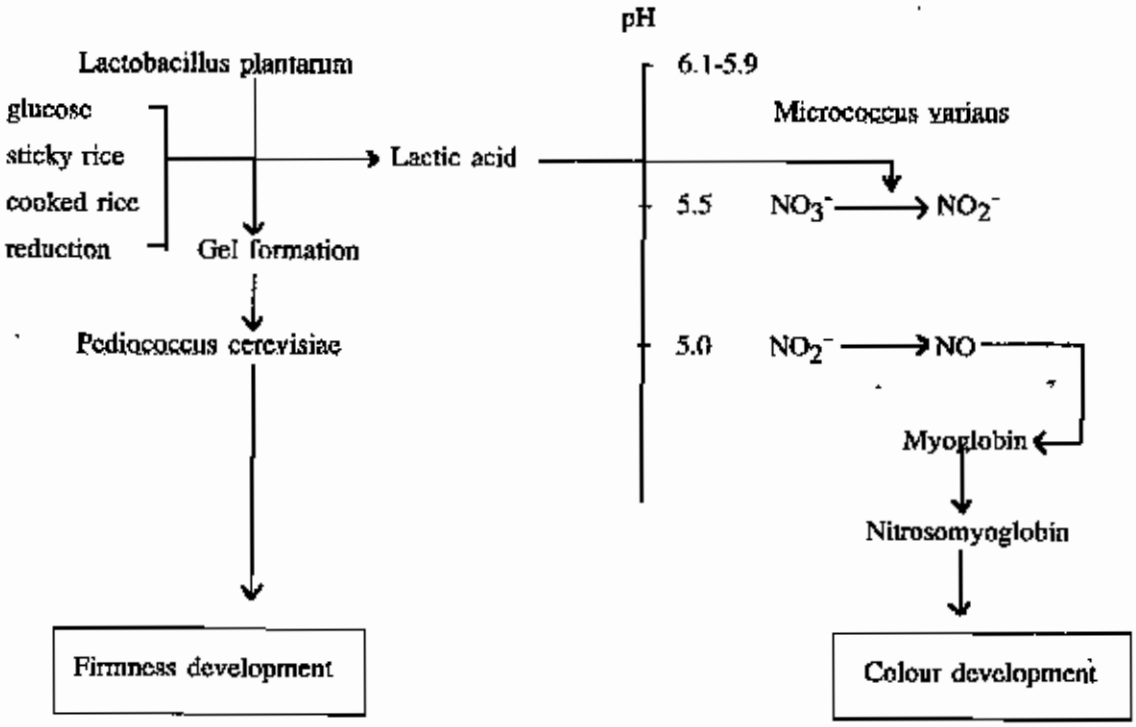

Fig. 1 Effect of mixed starter cultures on Nham system

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงสีของแหนม ณ ช่วงเวลาต่างๆ โดยศึกษาถึงผลของโซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์ และเชื้อ *Micrococcus varians* ต่อลักษณะสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์ เพื่อต้องการทราบว่าแหนมที่มีเพียงโซเดียมไนเตรทอย่างเดียว หรือโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียวในสูตรการผลิต ตลอดจนการใช้เชื้อ *Micrococcus varians* หรือไม่ใช้เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม จะมีผลต่อลักษณะสีของผลิตภัณฑ์อย่างไร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง: ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวางแผนการทดลองโดยแบ่งสิ่งทดลองออกเป็น 6 สิ่งทดลอง ใน 2 สิ่งทดลองแรกจะใช้เฉพาะโซเดียมไนเตรทเท่านั้น โดยสิ่งทดลองแรกจะใช้เชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคได้ ร่วมกับ *Micrococcus varians* ส่วนสิ่งทดลองที่สองจะไม่ใช้เชื้อ *Micrococcus varians* ร่วมกับเชื้อที่สร้างกรดได้ อย่างไรก็ตามส่วนสิ่งทดลองที่ 3 และ 4 จะใช้เฉพาะโซเดียมไนไตรท์เท่านั้น โดยแยกเป็นสิ่งทดลองทั้งสองในด้านการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมเช่นเดียวกับสิ่งทดลองที่ 1 และ 2 ตามลำดับ นอกจากนี้สิ่งทดลองที่ 5 และ 6 จะใช้ทั้งโซเดียมไนเตรทและโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมเช่นเดียวกับสิ่งทดลองที่ 1, 3 และ 2, 4 ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 1)

Table 1 Sodium nitrate, sodium nitrite and *Micrococcus varians* for this experimentation.

Treatment	$NaNO_3$ (ppm)	$NaNO_2$ (ppm)	Starter cultures
1	500	0	LP, PC, MV
2	500	0	LP, PC
3	0	200	LP, PC, MV
4	0	200	LP, PC
5	500	200	LP, PC, MV
6	500	200	LP, PC

LP = *Lactobacillus plantarum* (10^3 cfu/g)

PC = *Pediococcus cerevisiae* (10^6 cfu/g)

MV = *Micrococcus varians* (10^3 cfu/g)

กระบวนการผลิตแหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม

นำเนื้อหมูแดงมาเลาะเอามันออก ล้าง และทำให้สะเด็ดน้ำ เช็ดให้แห้งโดยใช้ผ้าสะอาดนำมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อนำไปเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส ส่วนหนังหมู นำมาเลาะเอาส่วนมันออกให้มากที่สุด นำมาต้มและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.1x 2-4 เซนติเมตร เก็บในห้องเย็นเช่นกัน ทำการเตรียมกระเทียมสดบดละเอียด พริกไทยป่น พริกขี้หนูบดละเอียด ข้าวเหนียวและข้าวเจ้าบดละเอียด กลูโคส เกลือแกง โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต โซเดียมอิริโธเบท โซเดียมไนเตรท (ปัจจัยที่ศึกษา) โซเดียมไนไตรท์ (ปัจจัยที่ศึกษา) และผงชูรส โดยเตรียมในสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 1 และที่ 2

ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ประมาณ 1 นาที จึงเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมที่เตรียมขึ้นในสัดส่วนดังตารางที่ 1 และ 2 โดยทำการผันแปรในส่วนของเชื้อ *Micrococcus varians* (ดังตารางที่ 1) ผสมเข้าด้วยกันในเครื่องผสมความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ประมาณ 2 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในเครื่อง stuffer และอัดเข้าสู่ถุงพลาสติกรูปทรงกระบอก รัดปลายหัวท้ายให้แน่นด้วยยาง หรือ clips เหล็ก เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Table 2 Ingredients and quantity for Nham production made with mixed bacterial starter cultures ($NaNO_3$, $NaNO_2$and *Micrococcus varians* as the main studied factors).

Ingredients	Quantity
Meat system:	
Ground lean pork (%)	60
Sliced pork skin (%)	40
Curing agents:	% of meat system
Sodium chloride (NaCl)	3
Sodium nitrate ($NaNO_3$)	0-0.05
Sodium nitrite ($NaNO_2$)	0-0.02
Sodium tripolyphosphate ($Na_5P_3O_{10}$)	0.3
Sodium erythobate	0.05
Starter cultures :	cfu/g of meat
system	
Lactobacillus plantarum	10^8
Pediococcus cerevisiae	10^6
Micrococcus varians	10^3
Carbohydrate source :	% of meat
system	
Glucose	0.5
Sticky rice	1
Cooked rice	8
Seasonings:	% of meat
system	
Minced garlic	4
White pepper powder	0.05
Minced bird chilli	1
MSG	0.2

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม

Lactobacillus plantarum และ *Pediococcus cerevisiae* ถูกเตรียมขึ้นเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยบ่มเพาะเชื้อในตู้อบ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ส่วน *Micrococcus varians* ได้เตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (Brain Heart Infusion Broth) โดยบ่มเพาะเชื้อในตู้อบ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

ก่อนที่จะนำเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการผลิตแหนม สิ่งที่จำเป็นต้องกระทำคือ การตรวจนับจำนวนเชื้อดังกล่าวเพื่อต้องการทราบจำนวนและสามารถนำไปคำนวณว่าควรจะต้องเติมลงในระบบเท่าใดจึงจะเป็นไปตามสัดส่วนที่ต้องการ โดยเชื้อที่สามารถสร้างกรดแลคติคได้จะถูกตรวจนับในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ส่วนเชื้อที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ จะถูกตรวจนับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar เมื่อทราบจำนวนคิดเป็น cfu/ml แล้ว จะนำมาคำนวณดังนี้

ตัวอย่างแหนมต้องการ *P. cerevisiae* 10^6 cfu/g ดังนั้น 1 กิโลกรัมของแหนมต้องการเชื้อถึง 10^9cfu แต่ใน stock culture ของ *P. cerevisiae* มี 10^{10} cfu/ml ดังนั้นใน 0.1 ml ของ stock culture จะมีเชื้อ *P. cerevisiae* 10^9 cfu เป็นต้น อย่างไรก็ตาม 0.1 ml ของ stock culture ยากต่อการเติมและผสมผสานให้เข้ากันในกระบวนการ ดังนั้นจึงเติมน้ำกลั่นที่ผ่าเชื้อแล้วลงไปอีกประมาณ 2 ml ก่อนเติมลงใน กระบวนการผลิต

การวิเคราะห์ทางด้านเคมีและฟิสิกส์

หลังเสร็จสิ้นการผลิตตัวอย่างแหนมจะถูกนำมาเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในทุกสิ่งทดลอง และจะทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางเคมีและฟิสิกส์ คือ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ค่าความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก (Total acidity as lactic acid) และค่าไนไตรท์ที่เหลืออยู่ (residual nitrite) ตามวิธีของ AOAC (1984) Wiriyacharee (1990), Pearson (1976) และทำการวัดค่าสี โดยใช้ Munsell book of colour ในช่วงเวลาที่ทำการบ่มไว้ 0, 6, 12, 18, 24, และ 48 ชั่วโมง

การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสจะใช้ผู้บริโภคทั่วไป จำนวน 8 ท่าน โดยก่อนที่จะทำการทดสอบชิม ผู้ทดสอบชิมทุกท่านจะได้รับการอธิบายให้มีความเข้าใจในความหมายของคุณลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์แหนม และค่าของ ideal score ของแต่ละลักษณะ จากนั้นจะทำการประเมินคุณภาพในลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ในแบบทดสอบ คือ สีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์ (colour) ลักษณะเนื้อที่ปรากฏ (visual texture) ความแน่นเนื้อ (firmness) ความนุ่มเนื้อ (juiciness) ความเนียนของเนื้อ (smoothness) ความเปรี้ยว (sourness) ความเค็ม (saltiness) ความมีกลิ่นของเครื่องเทศ (spiciness) และการยอมรับรวม (overall acceptability) โดยใช้ตัวอย่างที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง เป็นตัวอย่างทดสอบชิม ซึ่งใช้วิธีการประเมินแบบ Ideal ratio profile ในสิ่งทดลองต่างๆ (Wiriyacharee, 1990; วิริยจารี, 2535)

การวิเคราะห์และแปลผล

ข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าทางด้านเคมี ฟิสิกส์ และทางด้านประสาทสัมผัส จะนำมาวิเคราะห์ทางด้านสถิติ เช่น Analysis of variance และ Stepwise regression analysis โดยใช้ Stat-Packets Package (Walonick, 1987) ซึ่งมีปัจจัยที่ใช้ในการวิเคราะห์ Stepwise regression analysis จะเป็นเวลาที่ทำการหมัก ปริมาณโซเดียมไนเตรท ปริมาณโซเดียมไนไตรท์ และปริมาณของ *Micrococcus varians* ที่ใช้ในสูตรการผลิตต่อค่าต่างๆ ที่ต้องการศึกษาตลอดจนจะนำข้อมูลมาทำการสร้างกราฟเพื่อดูแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในค่าที่ต้องการศึกษาต่อเวลาของการหมัก 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การผลิตแหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม โดยได้ทำการวิจัยถึงผลของโซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์และการเติมหรือไม่เติมเชื้อแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์แหนมโดยเฉพาะเรื่องสีที่ปรากฏ จากการสุ่มตัวอย่างแหนมและนำมาวัดค่าของสีโดยใช้ Munsell book of colour ในระหว่าง 48 ชั่วโมงของการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า สีของแหนมจะเริ่มแตกต่างกันที่ชั่วโมงที่ 3-6 จากการสังเกตุและจากข้อมูลที่ปรากฏในตารางที่ 3 โดยที่สิ่งทดลองที่ 5 ที่ใช้ปริมาณโซเดียมไนเตรท 500 ppm และ โซเดียมไนไตรท์ 200 ppm ร่วมกับการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 3 ประเภท คือ *L. plantarum*, *P. cerevisiae* และ *M. varians* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีน้ำตาลอ่อนของเนื้อเป็นสีชมพูแดงที่เข้มกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้

เนื่องจาก *M. varians* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ อีกทั้งสิ่งทดลองที่ 5 มีไนไตรท์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยส่วนหนึ่ง ซึ่งไนไตรท์จะถูกเปลี่ยนไปในรูปไนตริคออกไซด์ซึ่งจะรวมตัวกับรงควัตถุในเนื้อ (myoglobin) และเปลี่ยนไปเป็นสีชมพูแดงของ nitrosomyoglobin และมีปริมาณไนเตรทในสูตรด้วยที่ *M. varians* สามารถเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ในระหว่างเวลานั้น ทำให้มีปริมาณไนไตรท์ที่มากพอที่จะเปลี่ยนเป็นไนตริคออกไซด์และเกิดการพัฒนาสีชมพูแดงดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้สิ่งทดลองดังกล่าวมีสีชมพูแดงเข้มกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ อีกทั้งการพัฒนาสีก็จะรวดเร็วกว่าสิ่งทดลองอื่นๆเช่นกันซึ่งจากข้อมูลในตารางที่ 3 ค่าสีที่ชั่วโมงเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์จะมีสีเหลืองแดงในค่า 5YR 8/2 และจะเริ่มเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเหลืองแดงที่มีความเข้มของสีแดงเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะสิ่งทดลองที่ 5 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.5YR 7/4 และจะเริ่มเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงสมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 18 คือ มีค่าเท่ากับ 10R 7/4 และมีสีแดงเข้มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากนั้นจนกระทั่งที่ชั่วโมง 48 ของการหมัก สามารถวัดเทียบสีได้ค่า 5R 7/4 ในขณะที่สิ่งทดลองอื่นๆ เริ่มมีการพัฒนาสีในเวลาต่อมา

Table 3 Colour change during 48 hours of Nham fermentation using with/without sodium nitrate and sodium nitrite and with/without *M. varians* as mixed starter cultures.

Treatment	Fermentation time (hours)					
	0	6	12	18	24	48
1	5YR 8/2	5YR 8/2	5YR 7/2	05YR 7/4	5YR 7/4	5YR 7/4
2	5YR 8/2	5YR 7/2	5YR 7/4	5YR 7/4	2.5YR 7/4	5YR 7/4
3	5YR 8/2	5YR 7/4	5YR 7/4	2.5YR 7/4	10R 7/4	10R 7/4
4	5YR 8/2	5YR 7/4	5YR 7/4	10R 7/4	7.5R 7/4	2.5YR 7/4
5	5YR 8/2	2.5YR 7/4	2.5YR 7/2	10R 7/4	5R 7/4	5R 7/4
6	5YR 8/2	5YR 7/4	5YR 7/4	2.5YR 6/4	10R 7/4	7.5R 7/4

Y = Yellow, R = Red

การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างระหว่างการหมักแหนม 48 ชั่วโมง โดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ที่เวลาเริ่มต้นความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 6.20-6.30 ความเป็นกรดเป็นด่างค่อนข้างคงที่ใน 12 ชั่วโมงแรกและเมื่อทำการหมักไปจนถึงชั่วโมงที่ 18 ความเป็นกรดเป็นด่างจะลดลงอย่างรวดเร็ว และลดลงเหลือประมาณ 4.46-4.57 ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 2) เมื่อพิจารณาโดยรวม พบว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างของผลิตภัณฑ์แหนมจะมีความสัมพันธ์กับเวลาของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ ดังแสดงในสมการ

$$pH = 6.4034 - 0.0406 \text{ (Time)} \quad R^2 = 0.9376$$

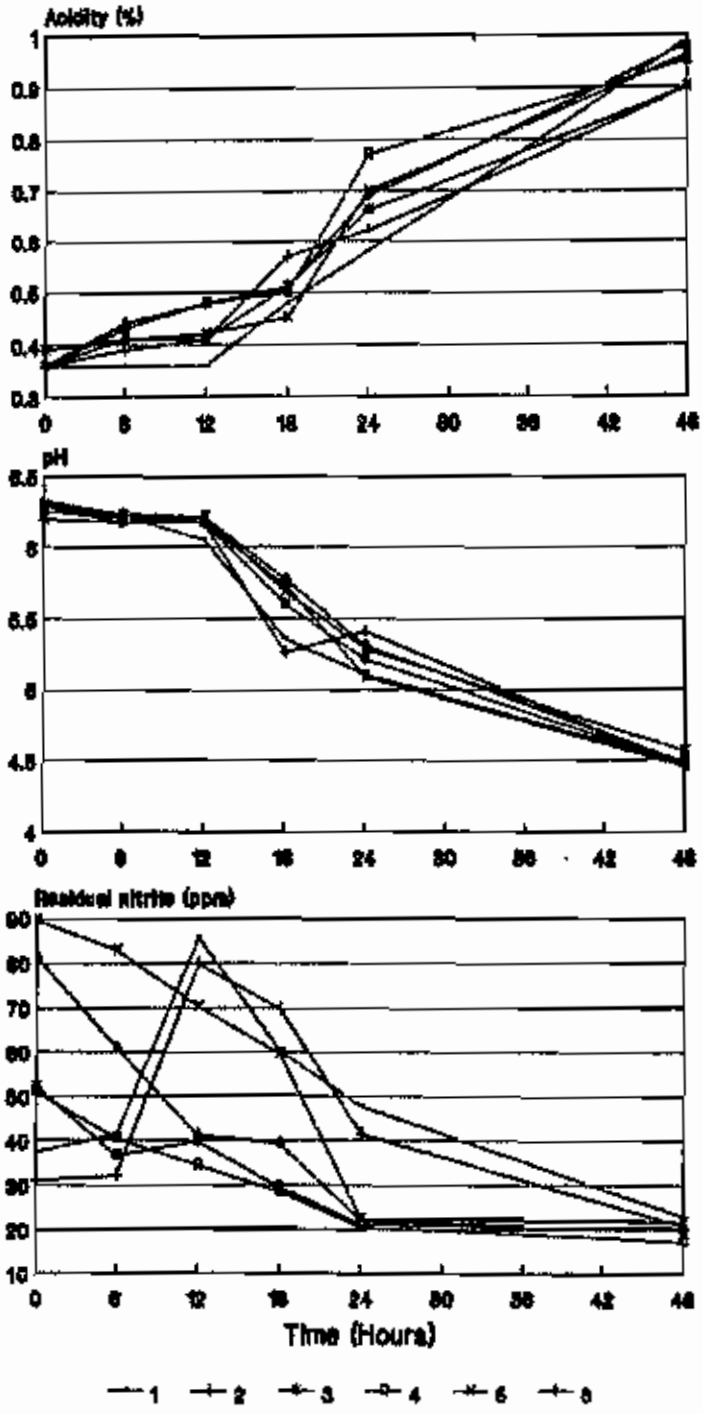

Fig. 2 Acidity, pH and residual nitrite changes during 48 hours of Nham fermentation made with mixed bacterial starter cultures with and/or without sodium nitrate/ sodium nitrite; with/without *M. varians*.

จากการไตเตรทหาปริมาณกรดแลคติคในตัวอย่างแหนมทั้ง 6 สิ่งทดลองในช่วงเวลา 48 ชั่วโมงของการหมัก พบว่าปริมาณกรดแลคติคจะเพิ่มอย่างช้าๆ และจะเพิ่มอย่างรวดเร็วที่ชั่วโมงที่ 18 ทั้ง 6 สิ่งทดลอง โดยหลังจาก 48 ชั่วโมงของการหมักปริมาณกรดแลคติคอยู่ในช่วงร้อยละ 0.901-0.991 (ภาพที่ 2) ในการที่ผลิตภัณฑ์แหนมมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติคได้ที่ใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นนั้นสามารถเปลี่ยนแหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า และกลูโคส ที่ใช้ในสูตรการผลิตให้กลายเป็นกรดแลคติค ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดทั้งหมดมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับค่าการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ซึ่งจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดทั้งหมดกับเวลาที่ทำการหมักผลิตภัณฑ์ พบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ โดยสามารถแสดงดังสมการ

$$\text{Acidity (\%)} = 0.2861 + 0.0128\ (\text{Time})\quad R^2 = 0.9328$$

จากการที่ระบบของการหมักผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีความเป็นกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีการพัฒนาสีที่ปรากฏเพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาของการหมักมีผลทำให้ปริมาณไนไตรท์ทั้งที่เติมลงไปในสูตรการผลิต หรือจากการที่เชื้อ *M. varians* เปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ มีปริมาณที่ลดลงเนื่องจากสภาพชิ้นเนื้อมี pH ลดลงเล็กน้อยในช่วงแรกของการหมักและอยู่ในสภาพ Reduction ไนไตรท์ที่เกิดขึ้นจะอยู่ในรูปกรดไนตรัส และกรดนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซไนตริคออกไซด์ ซึ่งทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบินให้สาร nitrosomyoglobin มีสีชมพูแต่ไม่คงตัว (Nurmi, 1966) ตัวมันเองสามารถเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูป metmyoglobin และให้ไนเตรท และออกซิเจนออกมาทำให้ชิ้นเนื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้ จึงต้องระมัดระวังอย่างมากในการเก็บรักษาแหนม ดังนั้นในสูตรการผลิตจึงมีการเติม sodium erythobate ลงในสูตรการผลิตเพื่อลดปัญหาดังกล่าว (รุจนะไกรกานต์, 2533) จากเหตุการณ์ดังกล่าวทำให้ปริมาณไนไตรท์ที่เหลือลดลง ซึ่งจากการวัดค่าไนไตรท์ที่เหลืออยู่ทั้ง 6 สิ่งทดลองที่เวลาต่างๆ พบว่าที่เวลาเริ่มต้นสิ่งทดลองทั้งหมดมีความแตกต่างในปริมาณของไนไตรท์ที่เหลืออยู่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ (ตารางที่ 4) และสิ่งทดลองที่ 1 และ 2 มีปริมาณที่ค่อนข้างน้อยกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ กล่าวคือมีปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ 37.62±0.24 และ 30.98±0.08 ppm ตามลำดับ เนื่องจากสิ่งทดลองทั้งสองในสูตรการผลิตนั้นไม่ใส่ไนไตรท์เลย แต่ต้องพึ่งพากิจกรรมของ *M. varians* และในสิ่งทดลองที่ 1 มีปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่มากกว่าสิ่งทดลองที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ เพราะในสูตรการผลิตของสิ่งทดลองที่ 1 มีการเติมเชื้อ *M. varians* ที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ทำให้มีปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่มากกว่าสิ่งทดลองที่ 2 ซึ่งไม่มีการเติม *M. varians* เลยในสูตรการผลิต เพียงแต่อาจจะอาศัยเชื้อตามธรรมชาติที่อาจมีบ้างเล็กน้อยเพื่อการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ มีผลทำให้ปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่น้อยกว่านั่นเอง เมื่อเวลาการหมักผ่านไปปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในสิ่งทดลองที่ 1 และ 2 จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 แล้วจึงลดลง (ภาพที่ 2; ตารางที่ 4) เนื่องจากมีการเปลี่ยนไนเตรทในสูตรไปเป็นไนไตรท์ตลอดเวลา ซึ่งจะเห็นว่าในช่วง 12 ชั่วโมง pH

ยังลดลงไม่มากนัก ทำให้ *M. varians* สามารถเจริญเติบโตและมีกิจกรรมได้อย่างดี กล่าวคือมี pH ประมาณ 6.05-6.30 หรือมีความเป็นกรดทั้งหมดประมาณร้อยละ 0.360-0.475 คิดเทียบในรูปกรดแลคติค

Table 4 Residual nitrite content during 48 hours of Nham fermentation made with mixed bacterial starter cultures with and/or without nitrate/nitrite, with and/or without *M. varians*.

Treatment	Residual nitrite (ppm)					
	Fementation time (hours)					
	0	6	12	18	24	48
1	37.62±0.24[a]*	41.34±0.10[a]	85.75±0.18[a]	60.23±0.11[a]	47.67±0.16[a]	23.14±0.15[a]
2	30.98±0.08[b]	32.22±0.98[b]	79.84±0.10[b]	69.75±0.17[b]	41.55±0.06[b]	20.88±0.15[b]
3	52.48±0.08[c]	36.47±0.08[c]	28.49±0.08[c]	39.86±0.08[c]	21.18±0.08[c]	22.27±0.09[c]
4	51.07±0.09[d]	40.55±0.09[d]	34.44±0.16[d]	28.75±0.08[d]	20.55±0.06[d]	17.44±0.04[d]
5	89.58±0.22[e]	82.86±0.10[e]	70.42±0.03[e]	59.74±0.12[e]	22.52±0.02[e]	21.84±0.10[e]
6	81.56±0.06[f]	81.09±0.09[f]	41.18±0.15[f]	39.26±0.10[f]	22.08±0.10[f]	20.12±0.06[f]

* mean ± standard deviation and mean within column with different .ow12

superscripts are different significantly at P<0.01

สิ่งทดลองที่ 3 และ 4 เป็นสิ่งทดลองที่มีเฉพาะปริมาณไนไตรท์อย่างเดียวเท่านั้น จากการทดลองพบว่าปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในชั่วโมงแรกๆ มีปริมาณสูงกว่าสิ่งทดลองที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.01 อีกทั้งพบว่าสิ่งทดลองที่ 3 และ 4 มีปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในระหว่างการหมักช่วง 48 ชั่วโมง ลดลงเรื่อยๆ ทั้งนี้เพราะว่าทั้ง 2 สิ่งทดลอง ไม่มีไนเตรทในสูตรที่จะเป็นแหล่งให้ *M. varians* เปลี่ยนเป็นไนไตรท์ได้

ส่วนสิ่งทดลองที่ 5 และ 6 เป็นสิ่งทดลองที่มีทั้งปริมาณไนเตรท และไนไตรท์ในสูตรการผลิตพบว่าในระหว่างการหมักมีปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ค่อนข้างมากกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.01 ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการหมัก (ภาพที่ 2; ตารางที่ 4) และจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาการหมักผ่านไป และพบว่าจะมีปริมาณลดลงเหลือ 20.12-21.84 ppm ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าที่เวลาเริ่มต้นของการหมักสามารถวัดปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 51-52 ppm โดยเฉพาะ

สิ่งทดลองที่ 3 และ 4 ทั้งๆ ที่ในสูตรการผลิตของสิ่งทดลองทั้งสองใส่ไนไตรท์เป็นส่วนประกอบถึง 200 ppm จะเห็นว่ามีการสูญเสียไปในระหว่างการผลิตถึงร้อยละ 74-74.5 ซึ่งอาจจะเกิดการสูญเสียเนื่องจากการติดตามเครื่องมือผสมสูญเสียในรูปก๊าซหรือเกิดรวมตัวกันกับส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน โปรตีน เป็นต้น (รุจนะไกรกานต์, 2533)

จากการวิเคราะห์โดยรวมสามารถเห็นได้ว่าปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่จะลดลงตามเวลาของการหมักที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ ตลอดจนมีความสัมพันธ์กับปริมาณไนเตรท์ที่เติมลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ อีกทั้งมีความสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีเชื้อ *M. varians* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ ดังสามารถแสดงในรูปสมการ (uncoded equation) ดังนี้

$$\frac{1}{\text{Residual nitrite (ppm)}} = 0.0212 + 0.007\,(\text{Time}) - 0.00001(NaNO_3) + 0.0011\,(M.varians)$$

$$R^2 = 0.6808$$

จากสมการจะเห็นว่า ถ้าหากมีการเติมโซเดียมไนเตรทมากในสูตรการผลิต จะทำให้ปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่มีมากด้วย อีกทั้งถ้าหากมีการใช้ *M. varians* ในสูตรการผลิตจะทำให้ปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ลดลง

ในการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม โดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมที่มีการใช้โซเดียมไนเตรทและ/หรือ โซเดียมไนไตรท์ร่วมกับการใช้และไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ในสูตรการผลิตนั้นพบว่า ค่า mean ideal ratio score ของลักษณะอื่นๆ ของผลิตภัณฑ์ (ยกเว้นลักษณะสีที่ปรากฏและการยอมรับรวม) จะมีค่าไม่แตกต่างกันในระหว่าง 6 สิ่งทดลองที่ทำการวิจัยครั้งนี้ (ตารางที่ 5)

ส่วนลักษณะสีที่ปรากฏพบว่าในสิ่งทดลองทั้ง 6 สิ่งทดลอง มีความแตกต่างทางด้านสีที่ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ (ตารางที่ 5) และพบว่าถ้าสิ่งทดลองที่มีการเติม *M. varians* จะมีค่า mean ideal ratio score ของค่าสีที่ปรากฏที่ใกล้เคียงกับค่าดังกล่าวของ ideal product กล่าวคือ มีค่าเท่ากับ 0.92-1.01 โดยเฉพาะสิ่งทดลองที่ 5 ที่มีการใช้ โซเดียมไนเตรท 500 ppm และโซเดียมไนไตรท์ 200 ppm ร่วมกับการใช้เชื้อ *M. varians* จะมีค่า mean ideal ratio score ของสีที่ปรากฏใกล้เคียงกับค่าดังกล่าวของ ideal product มากที่สุดคือ 1.02±0.02 (ตารางที่ 5)

ส่วนการยอมรับของผลิตภัณฑ์พบว่าสิ่งทดลองทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.01$ (ตารางที่ 5) จากการวิเคราะห์จะสังเกตุเห็นว่าสิ่งทดลองที่ใช้ *M. varians* ร่วมในกระบวนการผลิตจะมีค่าการยอมรับค่อนข้างสูงกว่าสิ่งทดลองที่ไม่ใช้ *M. varians* และพบว่าถ้าหากมีการใช้เฉพาะโซเดียมไนไตรท์ในสูตรการผลิตเท่านั้น การยอมรับของผลิตภัณฑ์จะค่อนข้างต่ำ กล่าวคือ มีค่า mean ideal ratio score เท่ากับ 0.79-0.81 แม้ว่าจะมีการใช้ *M. varians* ก็ตาม แต่ถ้าหากมีการใช้โซเดียมไนเตรท และโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับ *M. varians* จะมีค่าการยอมรับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ กล่าวคือ มีค่า Mean ideal ratio score ของการยอมรับรวมเท่ากับ 0.95±0.04 (ตารางที่ 5)

Table 5 Mean ideal ratio score of Nham attributes after 48 hours of fermentation made with mixed bacterial starter cultures with and/or without nitrate/nitrite, with and/or without *M. varians*.

Treatment	colour	Visual texture	Firmness	Juiciness
1	0.95±0.09*a	0.83±0.26	0.88±0.14	0.81±0.25
2	0.64±0.11b	0.76±0.12	0.75±0.11	0.67±0.16
3	0.92±0.02a	0.88±0.19	0.86±0.16	0.70±0.18
4	0.85±0.07c	0.86±0.13	0.88±0.14	0.68±0.26
5	1.02±0.02d	0.96±0.19	0.70±0.12	0.94±0.16
6	0.96±0.01a	0.90±0.18	0.86±0.19	0.80±0.19

Table 5 (continne)

Treatment	Smoothness	Sourness	Saltiness	Spiciness	Overall acceptability
1	0.82±0.16	0.92±0.16	0.90±0.20	0.95±0.09	0.91±0.01a
2	0.89±0.14	0.93±0.17	0.82±0.17	0.94±0.02	0.86±0.03b
3	0.77±0.14	0.50±0.23	0.96±0.13	0.90±0.04	0.79±0.04c
4	0.85±0.09	0.82±0.14	0.90±0.12	0.94±0.03	0.81±0.05c
5	0.80±0.18	0.94±0.17	0.94±0.15	0.98±0.04	0.95±0.04ad
6	0.80±0.17	0.92±0.16	0.85±0.16	0.94±0.03	0.92±0.02a

* mean + standard devintion;

1 use 9 general panelists

2 mean within column with different superscripts are different significantly at P<0.05

3 ideal ratio score for ideal product is 1.00

สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยครั้งนี้ การเติมโซเดียมไนเตรท และโซเดียมไนไตรท์ ร่วมกับการใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้มีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์ กล่าวคือ การใช้โซเดียมไนเตรท 500 ppm และโซเดียมไนไตรท์ 200 ppm ร่วมกับการใช้เชื้อ *M. varians* ปริมาณ 10^3 cfu/g ในสูตรการผลิตแหนม ทำให้อัตราการเกิดสีชมพูแดงของผลิตภัณฑ์เร็วและมีลักษณะที่ดี มีการยอมรับของผู้บริโภคค่อนข้างสูง และค่าสีที่ปรากฏจากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสพบว่ามีลักษณะที่ดี อีกทั้งพบว่า ปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ค่อนข้างต่ำหลังการหมัก ซึ่งอยู่ในระดับที่ต่ำมากจากที่กฎหมายอาหารกำหนด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้ มา ณ โอกาสนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

ลักขณา รุจจนะไกรกานต์. (2533). เทคโนโลยีอาหารเนื้อ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไพโรจน์ วิริยจารี. (2535). การวางแผนและการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

AOAC. (1984). Official Methods of Analysis (13rd ed.) Association of officaial Analytical Chemists, Washington, D.C.

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore

Deibel, R.H., C.F.Jr Niven., and G.D. Wilson, (1961). Microbiology of meat curing III. Some microbiological and related technological aspects in the manufacture of fermented sousages. Appl. Microbiol., 9:156-165.

Nurmi, E. (1966). Effect of bacterial innoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. Thesis, University of Helsinki, Finland, Acta Agra Finnica No. 108.

Pearson, D. (1976). The Chemical Analysis of Foods. Churchill Livingstone. London and New York.

Walonick, D.S. (1976). Stat-Packets. Walonick Associates Inc., Minneapoils, MN.

Wiriyacharee, P. (1990). The Systematic Development of a Controlled Fermentation Process Using Mixed Bacterial Starter Cultures for Nham, a Thai Semi-dry Sausage. Ph.D. Thesis in Product Development in Food Fermentation, Massey University, New Zealand.

Wiriyacharee, P., J.F. Brooks, M.D. Earle, and G. Page, (1990). The improvement of a traditional Thai fermented pork sausage by use of mixed starter cultures. In Fermentation Tecnhologies: Industrial Applications Conference, Massey University; Palmerston North, New Zealand.