

การพัฒนาผลิตภัณฑ์หมกโดยใช้เทคโนโลยี
เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม

1. แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสม
ต่อการผลิตหมก

ไพโรจน์ วรรณจารี¹, ลักขณา รุจนะไกรภรณ์¹ และ อัมปิน กุ้งชื้อ¹

NHAM PRODUCT DEVELOPMENT USING MIXED
BACTERIAL STARTER CULTURES

1. SUITABLE SOURCE OF CARBOHYDRATE
FOR NHAM PRODUCTION

Pairote Wriyacharee¹, Lakkana Rujanakraikarn¹ and Ampin Kuntiya¹

ABSTRACT : 6 types of carbohydrate sources; cooked rice, sticky rice, soya bean flour, tapioca, wheat flour, and corn starch; were used for this study. This experiment is to investigate a suitable carbohydrate source for Nham production using mixed bacterial starter cultures. For this experiment, it was found that 6% of cooked rice used in Nham formulation made the good quality of the product. The Nham is composed of high reducing sugars ($1.0120 \pm 0.0897\%$) which was suitable for the growth of nitrate reducing bacteria and then the culture effectively reduced nitrate to nitrite (187.4067 ± 1.3914 ppm). Additionally, the lactic acid bacteria used the residual reducing sugars to produce lactic acid. After 48 hours of fermentation, the product had total acidity as lactic acid ($1.1200 \pm 0.0200\%$), pH (4.54 ± 0.02) and residual carbohydrate ($2.76 \pm 0.08\%$). The panelists accepted the final product with colour score, firmness score, sourness score, spiciness score and overall acceptability score of 4.12 ± 0.72 , 3.67 ± 0.60 , 3.56 ± 0.51 , 3.18 ± 0.66 , and 3.62 ± 0.62 respectively.

บทคัดย่อ : แหล่งคาร์โบไฮเดรต 6 ประเภท ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว แป้งถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวสาลีและแป้งข้าวโพค นำมาใช้เป็นปัจจัยของการศึกษาถึงแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตหมกโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม จากการทดลองพบว่า การใช้ข้าวเจ้าร้อยละ 6 ในสูตรการผลิต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หมกที่มีคุณภาพดี ในสูตรดังกล่าวมี ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างสูง คิดเป็นร้อยละ 1.0120 ± 0.0897 ซึ่งเหมาะสมพอที่จะให้เชื้อแบคทีเรียประเภทที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์เจริญเติบโต และเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ดี กล่าวคือพบปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในสูตรหลังการผลิตเท่ากับ 187.4067 ± 1.3914 ส่วนในล้านส่วน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ส่วนหนึ่งสามารถ

¹ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50002.

¹ Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50002.

ให้เชื้อแบคทีเรียประเภทสร้างกรดแลคติกได้ ไรในการผลิตกรดแลคติกได้สูงถึงร้อยละ 1.1200±0.0200 มีความเป็นกรดเป็นค่าเท่ากับ 4.54±0.02 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตคงเหลืออยู่คิดเป็นร้อยละ 2.76±0.08 หลังจากเสร็จสิ้นการหมัก 48 ชั่วโมงแล้ว ผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่ได้มีการยอมรับที่ค้ำของผูบริโภค ทั้งในแง่สีที่ปรากฏ ความแน่นเนื้อ ความเปรี้ยวกลิ่นเครื่องเทศ และการยอมรับรวมโดยมีค่าสังเกตคะแนนความชอบลักษณะ ดังกล่าวเท่ากับ 4.12±0.72, 3.67±0.60, 3.56±0.51, 3.18±0.66 และ 3.62±0.62 ตามลำดับ.

คำนำ

ในประเทศไทยมีอาหารหมักพื้นบ้านประเภทเนื้อหลายชนิด ซึ่งยังคงมีการหมักแบบพื้นบ้านที่ต้องพึ่งพาเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แทนเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักประเภทหนึ่ง โดยปัจจุบันกระบวนการผลิตก็ยังคงมีการหมักที่ขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติเท่านั้น โดยทั่วไปจะมีกระบวนการผลิตที่ค่อนข้างใช้เวลานาน ใช้เวลาหมักนาน 3-5 วัน ขึ้นอยู่กับฤดูกาลผลิต คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่ค่อยมีความสม่ำเสมอ ผลิตภัณฑ์ขาดมาตรฐานซึ่งมีผลต่อการจำหน่ายในตลาดได้ จุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการผลิตหมักแทนเป็นจุลินทรีย์ประเภทสร้างกรดแลคติกได้ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (ค่านวณเตา, 2509; เคชะ-ภิญญาวัฒน์, 2518) โดยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถใช้หลังการโบไฮเดรตในการผลิตกรด มีทั้งแบคทีเรียประเภท Heterofermentative lactic acid bacteria ได้แก่ *Lactobacillus brevis* และประเภท Homofermentative lactic acid bacteria ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae* (ค่านวณเตา, 2509; เคชะ-ภิญญาวัฒน์, 2518; Srisomwong, 1985) *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* (Tanasupawat and Daengsubha, 1983) คาร์โบไฮเดรตจะถูกใช้โดยเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเป็นกรดหลักคือ กรดแลคติกให้กลิ่น รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีแก่ผลิตภัณฑ์ โดยวิธีการหมักแบบพื้นบ้านผลิตภัณฑ์แทนจะมีความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติกได้ประมาณร้อยละ 0.5-1.0 มีค่า pH เท่ากับ 4.45-4.55 (ค่านวณเตา, 2509) อย่างไรก็ตาม การหมักแบบพื้นบ้านทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพไม่ดี มีความปลอดภัยที่ต่ำต่อผูบริโภค เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษได้ (โสมะฐิติ, 2525) ดังนั้น ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเชิอบริสุทธิเริ่มต้นมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพแทนให้ดีขึ้น มีความปลอดภัยสูง อีกทั้งมีลักษณะสีที่ปรากฏ และลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดี มีอายุการเก็บที่ดีขึ้น (Bacus, 1981; Gibbs, 1987; Wriyacharee, 1990).

โดยเชิอบริสุทธิเริ่มต้นผสมที่นำมาใช้มี 2 ประเภทคือ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ ส่วนอีกประเภทหนึ่งจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวสไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ ก่อให้เกิดลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์ในแง่สีที่ปรากฏ และการมีสภาพเป็นกรดเกิดขึ้นจะทำให้สีที่ปรากฏมีการพัฒนาที่เร็วขึ้น อีกทั้งทำให้มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีด้วย.

อย่างไรก็ตามการใช้เทคโนโลยีเชิอบริสุทธิเริ่มต้นผสม หลังการโบไฮเดรตนับว่ามีบทบาทสำคัญมากต่อการที่เชิอบริสุทธิเริ่มต้นผสมดังกล่าวนี้สามารถใช้เพื่อผลิตกรดแลคติก ทำให้มีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ทั้งในแง่ลักษณะเนื้อสัมผัส และสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาหาแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตแทน โดยใช้เทคโนโลยีเชิอบริสุทธิเริ่มต้นผสม เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างกรดแลคติกได้อย่างมีประสิทธิภาพและทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพที่ดี.

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมแหล่งคาร์โบไฮเดรตและสิ่งทดลอง

คาร์โบไฮเดรตประเภทต่าง ๆ เช่น ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า แป้งถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวสาลี และแป้งข้าวโพด จะนำมาศึกษาโดยการทำให้คาร์โบไฮเดรตดังกล่าวสุกก่อน (Gelatinization) และทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของการผลิตแทน.

ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ จึงแบ่งการทดลองเป็น 6 สิ่งทดลอง โดยมีประเภทของคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยในการทดลอง ดังนี้ :

สิ่งทดลองที่ 1	ใช้ข้าวเหนียว	ร้อยละ 6	เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต
สิ่งทดลองที่ 2	ใช้ข้าวเจ้า	ร้อยละ 6	เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต
สิ่งทดลองที่ 3	ใช้แป้งถั่วเหลือง	ร้อยละ 6	เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต

สิงทตลอดที่ 4	ใช้แป้งมันสำปะหลัง	ร้อยละ 6	เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต
สิงทตลอดที่ 5	ใช้แป้งข้าวสาลี	ร้อยละ 6	เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต
สิงทตลอดที่ 6	ใช้แป้งข้าวโพด	ร้อยละ 6	เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต

โดยที่ข้าวเหนียว และข้าวเจ้า จะต้องผ่านการบดด้วยเครื่องบดก่อนนำมาใช้ ส่วนแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหลือเพียงแต่ทำให้สุก และทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้เท่านั้น.

กระบวนการผลิตแหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบิวรีสุทธีเริ่มต้นผสม

นำเนื้อหมูแดงมาละลายเอาไขมันออกให้มากที่สุด ดังด้วยน้ำสะอาดและสะเด็ดน้ำ เช็ดด้วยผ้าแห้งสะอาด นำมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อ และนำไปเก็บในหีองเย็นอุณหภูมิ 4°C (5 องศาเซลเซียส) ส่วนหนังหมูนำมาละลายเอาส่วนไขมันออกให้มากที่สุด นำมาต้มและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.1x2-4 เซนติเมตร เก็บในหีองเย็นเช่นกัน ทำการเตรียมกระเทียมสับคป ฟริกไทยป่น พริกขี้หนูบด กอโคส เกลือแกง โซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์ โซเดียมอีอีโรเบท ผงชูรส และโซเดียมไตรโพสเฟต และแหล่งคาร์โบไฮเดรต ตามสิงทตลอดของแต่ละสิงทตลอดกำหนด (แสดงในตารางที่ 1).

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ประมาณ 1 นาที จึงเติมเชื้อบิวรีสุทธีเริ่มต้นผสม ที่เตรียมขึ้นในสิงทตลอดตารางที่ 1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมความเร็ว 40 รอบต่อนาที ประมาณ 2 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในเครื่อง Stuffer และยัดส่วนผสมเข้าสู่ตุ่งพลาสติกรูปทรงกระบอก รัดปลายให้แน่นด้วยยาง หรือ Clips เหล็ก นำไปเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.

Table 1. Ingredients and quantity for Nham production made with mixed bacterial starter cultures (Carbohydrate source as the main studied factors).

Ingredients	Quantity
Meat system :	
Ground lean pork (%)	80
Sliced pork skin (%)	20
Curing agents: % of meat system	
Sodium chloride (NaCl)	3
Sodium nitrate (NaNO ₃)	0.03
Sodium nitrite (NaNO ₂)	0.02
Sodium tripolyphosphate (Na ₅ P ₃ O ₁₀)	0.3
Sodium erythobate	0.05
Starter cultures: cfu/g of meat system	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ³
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	10 ⁶
<i>Micrococcus varians</i>	10 ³
Carbohydrate source: % of meat system	
Glucose	0.5
Cooked rice, sticky rice	6
Soya bean flour, tapioca,	
Wheat flour, Corn starch	
Seasonings: % of meat system	
Minced garlic	4
White pepper (powder)	0.05
Minced bird chilli	2
MSG	0.2

* Studied factors.

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม

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

ก่อนที่จะนำไปเติมในกระบวนการผลิตหมัก เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นข้างต้นจะถูกนำมาเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสม และตรวจนับจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดได้ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bi-HI agar สำหรับ *M. varians* อย่างไรก็ตาม เชื้อเริ่มต้นทั้งสามประเภท จะถูกเตรียมขึ้นก่อนการหมักตามเวลาและอุณหภูมิที่กำหนดข้างต้นเสมอ เพื่อให้เชื้อมีกิจกรรมที่ดี จึงจะนำไปเติมในกระบวนการตามสัดส่วนที่กำหนดในตารางที่ 1.

การวิเคราะห์ทางเคมี

หมักที่เตรียมได้จากสิ่งทดลองต่างๆ ข้างต้น จะเก็บไว้ในตู้เย็น (Incubator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ทางเคมี คือ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ค่าความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก (Total acidity as lactic acid) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) และปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ (Residual nitrite) ตามวิธีของ AOAC (1984), Miller (1959), Pearson (1976), Wiriyacharee (1990) และ วิริยจारी กับ หันพงศ์กิตติกุล (2533, 2535) ที่เวลา 48 ชั่วโมง และหลังจากผลิตเสร็จก่อนเข้าตู้เย็น.

การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

การทดสอบครั้งนี้ จะเป็นการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ ในด้านสีของผลิตภัณฑ์ (Colour) ความแน่นเนื้อ (Firmness) ความเปรี้ยว (Sourness) ความมีกลิ่นเครื่องเทศ (Spiciness) และการยอมรับรวม (Overall acceptability) โดยนำตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่างมาทำการทดสอบชิม หลังจากหมักได้ 48 ชั่วโมง โดยการให้คะแนนตามความชอบในลักษณะต่างๆ ของแต่ละท่าน โดยสังเกตการให้คะแนนจะใช้แบบ 5-point hedonic scaling method ซึ่งการทดสอบชิมครั้งนี้ใช้ผู้บริโภคทั่วไป 16 ท่าน ทำการทดสอบและประเมินค่าดังกล่าว (Gatchalian, 1981; Institute of Food Technologists, 1981; และ วิริยจारी, 2535).

การวิเคราะห์และแปรผล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ Analysis of variance โดยใช้ Stat-Packets Package (Walonick, 1987).

ผลการทดลองและวิจารณ์

การผลิตหมักโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์ผสม เป็นการใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ เติบโตไปในระบบระหว่างการผลิต เพื่อให้เชื้อสามารถเปลี่ยนแหล่งคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และผลิตเป็นกรดแลคติกในที่สุด จากการทดลองครั้งนี้ การใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันจะมีผลทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ (ตารางที่ 2) โดยการใช้ข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในการผลิตจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการผลิตเสร็จมากที่สุด (ร้อยละ 1.3864 ± 0.0331) ส่วนการใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในการผลิต จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการผลิตเสร็จน้อยที่สุด (ร้อยละ 0.5141 ± 0.0102) หลังจากทำการหมักหมักได้ 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงจากค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.8924 ± 0.2813 ลดลงเหลือค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.3501 ± 0.2820 และเป็นที่น่าสังเกตว่าสิ่งทดลองที่ใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ไม่สามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้หลังจากหมักได้ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) และจากการทดลองหลังจาก 48 ชั่วโมงของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสิ่งทดลองต่างๆ จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $P < 0.01$ โดยที่ข้าวเหนียวยังคงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่มากที่สุด คือ ร้อยละ 0.8540 ± 0.0171 (ตารางที่ 2).

Table 2. Reducing sugars content after Nham production and after 48 hours of Nham fermentation using mixed bacterial starter cultures (Carbohydrate source as main studied factors).

Treatment	Reducing sugars (%)+Standard deviation	
	after production	after 48 hours of fermentation
1	1,3864±0.0331 ^a	0,8540±0.0171 ^a
2	1,0120±0.0897 ^b	0,4316±0.0124 ^b
3	0,5141±0.0102 ^c	0,0000±0.0000 ^c
4	0,8283±0.0479 ^d	0,4459±0.0065 ^b
5	0,9079±0.0025 ^e	0,2244±0.0056 ^d
6	0,7058±0.0137 ^f	0,1448±0.0078 ^e
Total	0,8924±0.2813	0,3501±0.2820

Note: mean within column with different superscripts differ significantly at P<0.05

น้ำตาลรีดิวซ์จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกมีผลทำให้ความเป็นกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้น จากการทดลองค่าความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติกหลังจากการผลิตมีค่าคิดเป็นร้อยละ 0,5861±0.0350 จะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1,1083±0.0305 หลังจากการหมักได้ 48 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันจะไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกรดทั้งหมดอย่างน้อยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ทั้งการผลิตและหลังจากหมักได้ 48 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกได้ มีความสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้ในระดับหนึ่ง มีข้อเสนอแนะว่า ถ้ามีน้ำตาลรีดิวซ์มากจะผลิตกรดได้มากขึ้น.

Table 3. Total acidity as lactic acid after Nham production and after 48 hours Nham fermentation using mixed bacterial starter cultures (Carbohydrate source as main studied factors).

Treatment	Total acidity as lactic acid (%)+Standard deviation	
	after production	after 48 hours of fermentation
1	0,5733±0.0289	1,0967±0.0289
2	0,5500±0.0458	1,1200±0.0200
3	0,5967±0.0153	1,0933±0.0451
4	0,5900±0.0458	1,0900±0.0200
5	0,5833±0.0155	1,1267±0.0451
6	0,6235±0.0231	1,1233±0.0115
Total	0,5861±0.0350	1,1083±0.0305

ส่วนค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์หมักหลังจากการผลิตสามารถวัดได้ มีค่าเฉลี่ย 6.14 ± 0.03 ซึ่งมีสิ่งทดลองเฉพาะสิ่งทดลองที่ 6 ที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต มีค่า pH แตกต่างจากสิ่งทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ (ตารางที่ 4) หลังจากทำการหมักหมมได้ 48 ชั่วโมง ค่า pH จะลดลงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.59 ± 0.08 จากการทดลองพบว่า การใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันมีผลทำให้การลดลงของ pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ (ตารางที่ 4) ซึ่งจากข้อมูลที่ทำกรทดลองแสดงถึงความเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์ ค่าความเป็นกรดทั้งหมดน่าจะขึ้นอยู่กับค่า pH เนื่องจากเครื่องวัด pH มีความแปรผันได้ในช่วงจุดทศนิยมอย่างมาก และค่าที่แสดงกับความแตกต่างกันก็เป็นค่าของจุดทศนิยมด้วย.

Table 4. pH of Nham after production and after 48 hours Nham fermentation using mixed bacterial starter cultures. (Carbohydrate source as main studied factors).

Treatment	pH \pm Standard deviation	
	after production	after 48 hours of fermentation
1	6.16 ± 0.02^a	4.54 ± 0.01^a
2	6.13 ± 0.02^a	4.54 ± 0.02^a
3	6.15 ± 0.02^a	4.69 ± 0.03^b
4	6.16 ± 0.02^a	4.69 ± 0.03^b
5	6.14 ± 0.02^a	4.50 ± 0.02^c
6	6.08 ± 0.04^b	4.59 ± 0.51^d
Total	6.14 ± 0.03	4.59 ± 0.08

Note : mean within column with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$.

จากการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตในผลิตภัณฑ์หมักที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ โดยพบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ใช้แป้งข้าวโพดในสูตรการผลิตมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงแตกต่างจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ กล่าวคือ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตคิดเป็นร้อยละ 11.1233 ± 0.3951 ส่วนการใช้ข้าวเหนียวในสูตรการผลิตหมักมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 2.4633 ± 0.2442 (ตารางที่ 5) หลังจากทำการหมักหมมได้ 48 ชั่วโมง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ และพบว่าการใช้แป้งข้าวโพดในสูตรการผลิต ปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลงมากกว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ค่อนข้างมาก (ตารางที่ 5) แต่ยังคงมีปริมาณเหลืออยู่มากกว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ เช่นกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น จากการใช้แป้งข้าวโพดในสูตรการผลิตมีค่าน้อยที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ไม่สามารถเปลี่ยนแป้งที่มีโมเลกุลสูงของแป้งให้กลายเป็นพวกกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพ.

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียประเภท Nitrate reducing bacteria คือ *Micrococcus varians* ซึ่งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และในสภาพความเป็นกรดไนไตรท์ จะเป็น Nitric oxide และจะรวมกับวงควัตถุของเนื้อคือ Myoglobin ได้สารสีชมพูที่ไม่คงตัวของ Nitrosomyoglobin ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์หลังจากเสร็จสิ้นการผลิตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.01$ ของสิ่งทดลองทั้ง 6 และพบว่าสิ่งทดลองที่ 2 มีปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่สูงแตกต่างจากสิ่งทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ (ตารางที่ 6) กล่าวคือ มีปริมาณ 187.4067 ± 1.3914 ppm. ซึ่งเป็นสิ่งทดลองที่ใช้ข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสิ่งทดลองที่ใช้ข้าวเจ้าในสูตรการผลิตนี้ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่อนข้างมาก (ร้อยละ 1.0120 ± 0.0897) ซึ่งเชื้อ *Micrococcus varians* สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์จำนวนหนึ่งในการเจริญเติบโต และมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์มากขึ้นนั่นเอง แต่หลังจากการหมักไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่จะลดลงในทุกสิ่งทดลองเหลืออยู่ในปริมาณค่าเฉลี่ย 20.0900 ± 1.2298 ppm. และปริมาณ

Table 5. Carbohydrate content after Nham production and after 48 hours of Nham fermentation using mixed bacterial starter cultures (Carbohydrate source as main studied factors).

Treatment	Carbohydrate (%)+Standard deviation	
	after production	after 48 hours of fermentation
1	2.4633±0.2442 ^a	2.1367±0.2274 ^a
2	3.4967±0.4051 ^b	2.7600±0.0854 ^b
3	11.1233±0.3951 ^c	9.2700±0.5927 ^c
4	4.1967±0.3753 ^d	3.9533±0.0462 ^d
5	4.1833±0.3453 ^d	3.7000±0.1900 ^d
6	4.6700±0.0700 ^e	4.1800±0.2750 ^d
Total	5.0222±2.9116	4.3333±2.3982

Note: mean within column with different superscripts differ significantly at P<0.05

ไนโตรที่ที่เหลืออยู่ในแต่ละสิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุการลดลงของปริมาณไนโตรที่นี้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก ทำให้ระบบมีสภาพความเป็นกรดมากขึ้น จึงทำให้ไนโตรที่มีการเปลี่ยนเป็น Nitric oxide และรวมตัวกับ Myoglobin ได้สารสีชมพูของ Nitrosomyoglobin นั้นเอง (Wiriyacharee, 1990) ซึ่งจากการทดลองของ Wiriyacharee (1990) ได้รายงานไว้ว่าเชื้อ *Micrococcus varians* จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในแครอทไปเป็นไนโตรที่ในช่วงแรกของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กิจกรรมของเชื้อในการเปลี่ยนในแครอทเป็นไนโตรที่นั้นควรเกิดขึ้นระหว่าง 2-16 ชั่วโมงแรกของการหมักได้กรอกทั่วไป (Deidel et al, 1961) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า *Micrococcus varians* ความถี่กิจกรรมเกิดขึ้นก่อนที่จะถูกยับยั้ง เนื่องจากสภาพสิ่งแวดล้อมที่เป็นกรดมากขึ้น การเกิดสีชมพูของแหนมเนื่องจาก *Micrococcus varians* ในสภาพที่ไม่มี Lactic acid bacteria ร่วมด้วย จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของแหนมได้เร็วขึ้น แหนมที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีแดงชมพู หลังจาก 3 ชั่วโมง นับจากเริ่มบรรจุ (Wiriyacharee, 1990) ดังนั้น การที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างมากในช่วงแรก ๆ ของการหมัก มีผลช่วยให้เชื้อ *Micrococcus varians* เจริญได้ดี และเปลี่ยนในแครอทเป็นไนโตรที่ได้ดี ซึ่งในสิ่งทดลองที่ใช้ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว น่าจะเป็นสิ่งทดลองที่ควรจะนำมาใช้ในการผลิตแหนมได้เหมาะสม โดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม ทำให้ได้คุณภาพของแหนมที่ดี ทั้งในแง่สีที่ปรากฏและความเปรี้ยวที่เกิดขึ้น.

Table 6. Residual nitrite after Nham production and after 48 hours of Nham fermentation using mixed bacterial starter cultures (Carbohydrate source as main studied factors).

Treatment	Residual nitrite (ppm)+Standard deviation	
	after production	after 48 hours of fermentation
1	180.9667±2.4150 ^a	21.1767±0.6986
2	187.4067±1.3914 ^b	20.4533±1.5544
3	120.1933±2.5132 ^c	19.9700±1.4762
4	122.6067±0.6986 ^c	19.6467±1.2756
5	137.9000±2.5148 ^d	20.6133±0.4850
6	129.0467±2.4150 ^e	18.6800±0.4800
Total	149.3533±28.2442	20.0900±1.2298

Note: mean within column with different superscripts differ significantly at P<0.05

จากผลการทดลองทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมทั่วไป 16 ท่าน ทำการทดสอบความชอบต่อผลิตภัณฑ์หมักที่ผลิตโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม ร่วมกับการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน จะมีผลแตกต่างกันทางด้านประสาทสัมผัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 7.

Table 7. Sensory evaluation of Nham made with mixed bacterial starter cultures and different carbohydrate source.

Treatment	Colour	Firmness	Sourness	Spiciness	Overall acceptability
1	3.81±0.54 ^a	2.68±0.48 ^a	3.88±0.50 ^a	3.25±1.00 ^a	3.31±1.01 ^a
2	4.12±0.72 ^a	3.67±0.60 ^b	3.56±0.51 ^a	3.18±0.66 ^a	3.62±0.62 ^{ab}
3	3.88±0.62 ^a	3.56±0.51 ^b	3.44±0.51 ^a	2.94±0.93 ^a	3.06±0.93 ^a
4	3.62±0.62 ^b	3.69±0.70 ^b	2.94±0.99 ^b	3.19±0.75 ^a	3.18±1.04 ^a
5	4.12±0.34 ^a	3.56±0.72 ^b	3.50±0.82 ^a	4.06±0.68 ^b	4.12±0.72 ^{ab}
6	3.50±0.63 ^c	3.44±0.51 ^b	3.06±0.93 ^{ab}	2.94±0.77 ^a	3.31±0.79 ^a
Total	3.84±0.62	3.44±0.68	3.39±0.79	3.26±0.87	3.44±0.91

Note: 1. use 16 general panelists

2. mean within column with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$

3. large score means better attribute than small score.

จากการทดลองความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์หมักที่ผลิต โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม ร่วมกับแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เป็นข้าวเจ้า ข้าวเหนียว แป้งถั่วเหลือง และแป้งสาลี มีลักษณะที่ปรากฏดีกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ กล่าวคือ มีสเกลความชอบในแง่สีที่ปรากฏเท่ากับ 3.81-4.12 (ตารางที่ 7) ผลิตภัณฑ์หมักที่ผลิตโดยใช้ข้าวเหนียวในสูตรการผลิต มีความแน่นเนื้อที่น้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (มีค่าสเกลความชอบเท่ากับ 2.68±0.48) ส่วนในด้านความเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์หมักที่ใช้แป้งมันฝรั่งและแป้งข้าวโพดในสูตรการผลิต จะมีความเปรี้ยวที่น้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตประเภทอื่น ๆ (มีค่าสเกลความชอบเท่ากับ 2.94-3.06) นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์หมักที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะกลิ่นของเครื่องเทศที่ดีกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (มีค่าสเกลความชอบเท่ากับ 4.06±0.68) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์หมักที่ผลิตโดยใช้ข้าวเจ้าหรือแป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความชอบรวมที่ดีที่สุด มีสเกลความชอบรวมเป็น 3.62-4.12

จากลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์หมักทั้ง 6 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าหมักที่ใช้ข้าวเจ้าและแป้งสาลี เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต มีลักษณะรวมต่าง ๆ ที่ค่อนข้างดีกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตแหล่งอื่น ๆ แต่ถ้าพิจารณาประกอบกับค่าทางเคมีข้างต้นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสม จึงน่าจะเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตประเภทข้าวเจ้าที่สามารถใช้ร่วมกับการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์ผสมแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์หมักที่มีคุณภาพดี ทั้งในแง่การผลิตกรดแลคติก การสร้างสีที่ดีของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตหมักโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม คือ ข้าวเจ้า ซึ่งสูตรการใช้ข้าวเจ้าดังกล่าวในการผลิตจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่อนข้างสูง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียประเภท Nitrate reducing bacteria เจริญเติบโตและเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้ค่อนข้างดี และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือสามารถให้ Lactic acid bacteria นำไปสร้างกรดได้ค่อนข้างดี และมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีความแน่นเนื้อที่ดี และมีผลต่อการพัฒนารสชาติปรากฏที่ดีด้วย อีกทั้งมีการยอมรับของผู้บริโภคที่ดีเช่นกัน.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ได้สนับสนุนการวิจัย มา ณ โอกาสนี้ด้วย.

เอกสารอ้างอิง

- คำนวนตา, จรูญ. (2509). การค้นคว้าเรื่องหมักไทยคอนที่หนึ่งว่าด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- เคระภีญาวัฒน์, สมบูรณ์. (2518). การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในระหว่างการทำหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- วิริยาริ, ไพโรจน์ และ หันพงศ์กิตติกุล, ชวิญ. (2533, 2535). ปฏิบัติการอุตสาหกรรมการหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิริยาริ, ไพโรจน์. (2535). การวางแผนและการวิเคราะห์ทางค่านประสาธสัมพันธ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- โสมะฐิติ, สุทธิ. (2525). การสำรวจเชื้อโรคดำใต้บางชนิดในหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- AOAC. (1984). Official Methods of Analysis (13rd edition) Association of official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Bacus, J. (1984). Utilization of Microorganisms in Meat Processing. Research Studies Press, Ltd., England.
- Deibel, R.H., Niven, C.F. Jr., and Wilson, G.D. (1961). Microbiology of meat curing III. Some microbiological and related technological aspects in the manufacture of fermented sausages. Appl. Microbiol., 9:156-165.
- Gatchalian, M.M. (1981). Sensory Evaluation Methods with Statistical Analysis. Collage of Home Economics, University of the Philippines, Philippines.
- Gibbs, P.A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement, 51S-58S.
- Institute of Food Technologists. (1981) Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. Food Technology, 35(11): 50-59.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31:426-428.
- Pearson, D. (1976). The Chemical Analysis of Food. Churchill Livingstone: London and New York.
- Srisomwong, P. (1985). The study of lactic acid bacteria in Nham. M.Appl. Sci. Thesis, University of New South Wales, Australia.
- Tanasupawat, S., and Daengsubha, W. 1983. *Pediococcus* species and related bacteria found in fermented foods and related materials in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol., 29:487-506.

Walonick, D.S. (1987). Stat-Packets. Walonick Associates Inc., Minneapolis, 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.
