Abstract

Research on development of unique natural beef products delimited firstly to the development of fermented beef products, using known sources of raw native Thai beef materials produced under natural production system. The major emphasis was to use bacteriocin-producing and potentially probiotic lactic acid bacteria, discovered by researchers of the Meat Technology Research Network Center (MTRNC), as starter culture. The second research delimitation was to study branding potential of beef products, produced mainly from rough cuts and value-added primal cuts. Total study period was 3 years. The first year of the study focused on the development of meat fermentation laboratory and knowledge and technical transfer on Western style fermented meat (salami) production. The second and third years of study focused on performing research on the development of unique natural native Thai beef products, which consisted of 3 major parts of study as follows.

Part 1: the development of natural beef products with potential for promoting as branded products, which consisted of 2 groups of products. Firstly, western style beef products included emulsion type meat products, beef ham, beef bacon, and beef jerky. Secondly, Thai native meat products included mirror beef product, beef dad-deaw, nham, and sour sausages.

Part 2: The development of fermented native Thai meat products (probiotic beef nham) consisted of 3 research projects as follows.

2.1 Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 and Sb 2 on microbiological property and quality of beef nham: The objective was to study the potential of using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 and Sb 2 as starter culture for producing beef nham (utilizing beef tendon instead of the traditional ingredient, pork rind). The goal was to produce safer fermented beef products and to obtain unique fermented Thai beef products.

The results of this research showed that comparing to treatment without starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 and Sb 2 were the best in inhibiting yeast and mold and coliforms. In addition, no growth of *Escherichea coli (E. coli)*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was observed in all treatments. For nham quality, the use of starter cultures affected total acidity, pH values, and instrumental color (CIE L*, a*, and b*). Nham with *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 resulted in the highest total acidity and lowest pH values. Comparing to control, the use of both *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 and Sb 2 resulted in redder products. Therefore, both *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 and Sb 2 could be used as a starter culture, with probiotic potential property, for producing safer beef nham with more palatable color.

2.2 Microbiological property and quality of beef nham produced either with *Pediococcus pentasaceus* TISTR 536 (*P. pentasaceus* TISTR 536) or *Lactobacillus salivarius* D 4 (*Lb. salivarius* D4): The objective was to study the potential of using *P. pentasaceus* TISTR 536 and *Lb. salivarius* D 4 as a starter culture for producing beef nham (utilizing beef tendon instead of the traditional ingredient, pork rind). The goal was to produce safer fermented beef products and to obtain unique fermented Thai beef products.

The results of this research showed that comparing to control, each treatment with starter culture, including commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47, Germany), *P. pentasaceus* TISTR 536, and *Lb. salivarius* D 4, respectively, had more lactic acid bacterial numbers. This property is preferable as lactic acid bacteria produce substances which can inhibit spoilage and pathogenic microorganisms. Treatment added with *P. pentasaceus* TISTR 536 resulted in the lowest number of yeast and mold. After 3 days of fermentation, the number of coliforms was reduced in all treatments produced with starter cultures. In addition, no growth of *E. coli*, *Salmonella* spp., and *S. aureus* was observed in all treatments. For quality of beef nham, the starter culture added treatments had lower pH values and higher amount of total acid compared to control. The *Lb. salivarius* D 4 treatment had the lowest pH value with highest amount of total acid. In addition, treatment with *Pacovis* RCI – 47 resulted in the highest L* value (lightest color) with the most decreased a* value (the least red), resulting in less palatable product. Therefore, there is a potential in using *P. pentasaceus* TISTR 536 and *Lb. salivarius* D 4 as a starter culture for beef nham production.

2.3 The study on quality, refrigerated shelf-life, and consumer acceptance of fermented native Thai meat product (beef nham without tendon and chilli peppers added). The objective was to study the potential of using the 4 bacteriocins producing with probiotic potential lactic acid bacteria, which were discovered by researchers of MTRNC, as a starter culture in beef nham production. The study investigated chemical, physical, and microbiological quality, as well as consumer acceptance, as preliminary information for choosing starter culture for further in-depth research on beef nham quality. For this study, due to much variation occurred during instrumental texture profile analysis and sensory evaluation in previous studies (2.1 and 2.2), beef tendon and chilli peppers were not added in beef nham.

Results showed that after 3 days of fermentation, nham produced without starter culture had no difference in total acidity and pH value, compared to the starter culture added treatments. Except for treatment with *P. pentosaceus* TISTR 536 which had higher pH value than the other treatments did after 3 days of fermentation at 30°C and after 4 days of storage at 4°C. All treatments had high moisture content with water activity (Aw) of 0.97 during fermentation and storage. This might be due to the production of

beef nham using plastic casing resulted in less water evaporation from the product. After 3 days of fermentation, all treatments had no difference in the number of lactic acid bacteria. In addition, no growth of *E. coli*, *Salmonella* spp., and *S. aureus* was observed in all treatments. In overall, the number of coliforms decreased after 3 days of fermentation. Treatments with *Pacovis* RCI – 47 and *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 tended to have lower number of coliforms when compared to the control treatment. Furthermore, the number of yeast and mold of all treatments decreased after 3 days of fermentation. However, the level of yeast and mold in all treatments was higher than 2 log cfu/g, the recommended level by the Thai community standard 470/2548 for beef nham. Results indicated that *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 had the lowest ($P<0.05$) yeast and mold number compared to other treatments, but did not ($P>0.05$) different from that of *P. pentosaceus* TISTR 536.

For color quality, nham with *Pacovis* RCI – 47 treatment tended to be paler (lighter, more yellow, and less red) compared to other treatments ($P<0.05$). After 3 days of fermentation, the outer surface color measured through the package of treatments with *lactis* spp. *lactis* P 2 and Sb 2 was redder ($P<0.05$) than that of the control treatment. However, after 4 days of refrigerated storage, treatments with *lactis* spp. *lactis* P 2 and Sb 2, as well as *P. pentosaceus* TISTR 536, had redder ($P<0.05$) outer surface color compared to control.

For instrumental hardness measurement, after 3 days of fermentation, the control treatment was harder ($P<0.05$) than those with starter cultures. But no difference ($P>0.05$) in hardness values was observed among treatments with starter cultures. After 4 days of refrigerated storage, the control treatment continued to have the highest ($P<0.05$) hardness value compared to treatments with starter cultures added. However, the *P. pentosaceus* TISTR 536 treatment had lower ($P<0.05$) hardness value compared to *lactis* spp. *lactis* P 2 and Sb 2, respectively.

Results on consumer acceptance on color of beef nham were in agreement with instrumental measurement. Consumers scored their likeness on color of beef nham treated with *Pacovis* RCI – 47 and *Lb. salivarius* D 4 lower than other treatments ($P<0.05$). Color likeness scores of nham treated with *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2, *P. pentosaceus* TISTR 536, and *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 were not different ($P>0.05$) from that of control. However, consumer likeness score on tangy or sour taste of treatment with *P. pentosaceus* TISTR 536 was lower ($P<0.05$) than those of control, *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2, and Sb 2, respectively. In overall, likeness scores on tangy taste, nham aroma, nham flavor, and overall characteristics of treatments with *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 and Sb 2 did not differ ($P>0.05$) from those of control. But treatment with *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 tended to inhibit yeast and mold better than ($P<0.05$) the control and *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 treatments. Therefore, *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 could be

bacteriocin producing and potential probiotic starter culture for beef nham production. However, due to slower pH reduction in beef nham, fermentation time should be extended longer than 3 days. Furthermore, the addition of glucono-delta-lactone may help accelerate pH reduction to a safer level for raw consumption.

Part 3: The development of semi-dried fermented western style meat products, which normally were added with imported commercial starter culture. The research consisted of 2 study projects as follows.

3.1 Semi-dried fermented western style meat product produced from native Thai beef. This project consisted of 2 parts as follows.

3.1.1 Preliminary study on the development of Thai native semi-dried fermented western style beef products (Beef Snack Sticks or Slim Jims). The objectives were to 1) develop the recipe of Thai native dried or semi-dried fermented western style beef products (Beef Snack Sticks or Slim Jims); 2) develop the fermentation and ripening (drying) time for production of Thai native dried or semi-dried fermented western beef products; and 3) obtain the preliminary information on chemical and microbiological quality of the developed product.

The preliminary study was done by production of 3 slim jims recipes; 1) American recipe, 2) spicy recipe, and 3) recipe adjusted from mum, the Thai northeastern fermented meat product. Collagen casing with diameter of 19 mm. were used. Each slim jims sausage was linked into 6-inch long and fermented and dried in a temperature and relative humidity controlled chamber. The production steps included fermentation, heating, and ripening (or drying). The drying step was conducted at lower temperature and relative humidity.

From preliminary quality examination, the western and mum recipe slim jims had basic property of dried or semi-dried sausages. However, increasing fermentation time longer than 17 hours could help reducing pH value and moisture content of the products. For the spicy recipe, problem with case-hardening was found. This might be due to the difference in rate of moisture migration from the center of the sausage and that from sausage surface to the environment, which could also be influenced by a shorter fermentation period.

The heating step, by increasing the chamber temperature to 70°C for 2 hours after fermentation period, could increase product safety by reducing some pathogenic microorganisms. The use of heating in fermented meat product production is practiced in the US fermented meat production. However, heating to 70°C might destroy probiotic lactic acid bacteria. If probiotic lactic acid bacteria can tolerate 70°C, the products added with these starter cultures and produced with heating step will be much

safer. In the next study, heating temperature might be reduced to 50°C, a temperature at which was previously indicated that *P. pentosaceus* TISTR 536 could survive and was able to produce bacteriocins.

3.1.2 Development of semi western style semi-dried fermented native Thai beef product: Semi-dried Mum Snack Stick. The objectives of this research were to 1) develop semi western style semi-dried fermented native Thai beef product (Semi-dried Mum Snack Stick), produce a safer product by using western style fermented sausage production technology, and perform preliminary study on its quality examination; 2) study the effects of using bacteriocin producing and potential probiotic lactic acid bacteria as starter culture compared to the use of imported commercial starter culture (Pacovis RCI-47) and to that produced without starter culture on basic quality of the product; and 3) to study consumer acceptance of the product.

Preliminary study from 3.1.1 resulted in the use of mum recipe for this present study. In addition, heating temperature was reduced to 60°C, a maximum temperature at which a starter culture might be able to survive. Results indicated that mum snack sticks produced by using western style production technology could be considered as dried or semi-dried beef product. This assumption was based on its pH value of less than 5.3, Aw of 0.82-0.83 which was lower than 0.91, and a moisture content of 35%. After production, mum sticks had more than 50% moisture lost. These properties, therefore, could be considered as shelf-stable meat product when it was kept in a proper packaging system. However, more study on other quality characteristics, shelf-life, and consumer acceptance, using larger numbers of consumers, should be performed. Production of mum sticks using starter cultures together with 2-hour heating process at 60°C were able to increase product safety by controlling coliforms and yeasts. Under the study condition, *P. pentosaceus* TISTR 536 grew better than *L. lactis spp. lactis* P 2. However, the effects of starter culture with heating process on pathogen control should be confirmed by microbial challenge study. Microbiology and chemical quality of treatment added with *P. pentosaceus* TISTR 536 were not different from those using commercial starter culture (Pacovis RCI-47). But mum sticks produced with Pacovis RCI-47 were redder than those produced using starter cultures discovered by the MTRN researchers. However, darker red color of mum sticks is a common color found in the traditional Thai mum product. In addition, further study on their probiotic property, starter culture survival during the production process, and product shelf-life, as well as its health benefit are needed.

3.2 Delopment of semi-dried fermented meat product (salami with green tea added): the objectives were to 1) study the effects of green tea extract on microbiology and quality of salami. 2) study the effects of green tea extract on extending shelf-life of fresh meat and salami. 3) study the optimum fermentation and ripening periods for beef salami production.

Effects of green tea extract at concentration of 0, 10, 20 g/kg on salami oxidation were observed on 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days of production time. Results indicated that green tea extract inherits anti-oxidative activity. The 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values of green tea extract added treatments were consistent (0.273 mg malonaldehyde (MDA)/kg salami) during production time, while that of control treatment was at 0.782 MDA/kg. For microbiological quality, lactic acid bacteria, the beneficial bacteria, were higher in treatments with green tea extract than the control treatment. Coliforms were lower in treatments with green tea extract added than in the control treatment. Yeasts and molds on casing surface were lower in green tea extract added treatments. No difference on pH values was found between treatments. But the control treatment had Aw (0.898) and moisture content (36.38%) higher ($P<0.0001$) than those in the green tea extract added treatments. However, no difference in Aw and moisture content was found between the green tea extract added treatments.

From this study, it can be concluded that the optimum production time for beef salami was 28 days, considering from products Aw of less than 0.91, moisture content of less than 35%, and pH value of less than 5.2. At 28 days of production, treatments with 0, 10, and 20 g green tea extract/kg had Aw of 0.870, 0.884, and 0.887, moisture content of 29.69, 31.21, and 31.15%, and pH values of 4.56, 4.51, and 4.52, respectively.

Considering the appearance of salami, treatment with 20 g green tea extract/kg was less red compared to other treatments. Since red color is preferred by consumers. The addition of green tea extract at 10 g/kg would be sufficient for increasing product safety of salami produced with natural native Thai beef as main raw material. In addition, production of beef salami with good color quality added with this level (10 g/kg) of green tea extract could be done in the same production time.

บทคัดย่อ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอกลักษณ์จากเนื้อโคธรรมชาติ มีขอบเขตการวิจัยมุ่งเน้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อโคไทย ที่ใช้วัตถุดิบจากเนื้อโคพื้นเมืองที่ทราบแหล่งที่มาและอยู่ภายใต้ระบบการผลิตเนื้อโคธรรมชาติ (natural beef) โดยเน้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ภายใต้ระบบการหมักเปรี้ยว (fermentation) ด้วยการนำกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิต bacteriocins และมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็น probiotic ที่ค้นพบโดยนักวิจัยในโครงการมาใช้ในการผลิต และศึกษาผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นไปได้ในการสร้างตราสินค้า โดยเน้นการใช้ประโยชน์จากเนื้อชิ้นส่วนรองที่ได้จากการตัดแต่ง และสร้างมูลค่าเพิ่มจากการใช้ประโยชน์จากเนื้อชิ้นส่วนหลัก ระยะเวลาดำเนินการทั้งหมด 3 ปี โดยในปีที่ 1 เป็นการปรับปรุงห้องปฏิบัติการแปรรูปเนื้อหมักและรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแบบตะวันตก (ซาลามิ) ในปีที่ 2 และ 3 เป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอกลักษณ์จากเนื้อโคธรรมชาติ โดยมีการดำเนินการศึกษาวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ

ตอนที่ 1 พัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อโคธรรมชาติที่มีความเป็นไปได้ในการสร้างตราสินค้า ซึ่งได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ก) กลุ่มผลิตภัณฑ์ตะวันตก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้ออิมัลชั่น แฮมเนื้อ เบคอนเนื้อ และเนื้อเจอร์กี้ ข) ผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน ได้แก่ เนื้อกระจก เนื้อแดดเดียว แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว

ตอนที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเปรี้ยวแบบพื้นบ้าน (แหนมเนื้อโคโปรไบโอติก) ซึ่งมีการศึกษาแบ่งเป็น 3 โครงการ ได้แก่

2.1 ผลของการใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ต่อคุณสมบัติทางจุลินทรีย์และคุณภาพของแหนมเนื้อโค มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 มาเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโคที่ใช้เอ็นโคแทนหนังหมู เพื่อให้ได้แนวทางการผลิตเนื้อหมักจากเนื้อโคที่มีความปลอดภัยทางด้านอาหาร และได้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจากโคพื้นเมืองไทยที่มีความเป็นเอกลักษณ์

ผลการศึกษาพบว่า การใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Yeast/Mold และ Coliforms ตามลำดับ ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และตรวจไม่พบเชื้อ *Escherichea coli (E. coli)*, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ในแหนมทุกกลุ่มทดลอง ในด้านคุณภาพ พบว่าการใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ มีผลต่อปริมาณกรดทั้งหมด ค่า pH และค่าสี (CIE L* a* และ b*) โดยการใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุดและมีค่า pH ต่ำสุด และยังพบว่าการใช้ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 มีผลให้แหนมเนื้อโคสีแดงเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 เป็นกล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติกที่สามารถนำมาเป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมเนื้อโคได้ สามารถเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีที่น่ารับประทานมากขึ้น

2.2 คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์และคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโคเมื่อใช้ *Pediococcus pentasaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 เป็นกล้าเชื้อ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D 4 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโคที่ใช้เอ็นโคแทนหนังหมู เพื่อให้ได้แนวทางการผลิตเนื้อหมักเปรี้ยวจากเนื้อโคที่มีความปลอดภัยทางด้านอาหาร และได้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเปรี้ยวจากโคพื้นเมืองไทยที่มีความเป็นเอกลักษณ์

ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 กลุ่มทดลอง มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลดีต่อการผลิตแหนม เพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียบางกลุ่มได้ ขณะเดียวกัน การใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถลดจำนวน Yeast/Mold ลงเหลือจำนวนน้อยที่สุด และพบว่าภายหลังระยะเวลาการหมัก 3 วัน แหนมจากทุกกลุ่มทดลองที่เติมกล้าเชื้อ มีจำนวน Coliforms ลดลง นอกจากนั้นยังตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในทุกกลุ่มทดลอง ทางด้านคุณภาพ พบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า pH ต่ำและมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่เติม *Lb. salivarius* D 4 มีค่า pH ต่ำสุดและปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 ทำให้สีที่ผิวด้านนอกของแหนมมีค่าความสว่างมากที่สุด และค่าสีแดงลดลงมากกว่าทุกกลุ่มทดลอง ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีความน่ารับประทานลดลงเนื่องจากมีสีที่ซีดกว่าทุกกลุ่มทดลอง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D 4 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค

2.3 ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพ การเก็บรักษา และการยอมรับของผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแบบพื้นบ้าน (แหนมเนื้อโคไม่เติมเอ็นโคและพริก) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นที่สามารถสร้างสาร bacteriocins และมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็น probiotic ทั้ง 4 ชนิดที่ค้นพบโดยนักวิจัยของศูนย์เครือข่ายฯ มาใช้ในการผลิตแหนมเนื้อโค เพื่อศึกษาคุณภาพ (เคมี กายภาพ และจุลินทรีย์) และความชอบของผู้บริโภค และให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการพิจารณาเลือกกล้าเชื้อแลคติกสำหรับศึกษาคุณภาพของแหนมเนื้อโคในเชิงลึกต่อไป ทั้งนี้จากปัญหาความแปรปรวนสูงในการตรวจวัดลักษณะเนื้อสัมผัส และคุณภาพทางประสาทสัมผัสในโครงการก่อนหน้า (2.1 และ 2.2) จึงใช้แหนมเนื้อโคที่ไม่เติมเอ็นโคและพริกในการศึกษาส่วนนี้

ผลการศึกษาพบว่า ภายหลังการหมัก 3 วัน แหนมที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ มีปริมาณกรดแลคติกและค่า pH ไม่แตกต่างจากแหนมที่ใช้กล้าเชื้อชนิดอื่นๆ ยกเว้นแหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่มีค่า pH สูงกว่าแหนมทุกกลุ่มทั้งหลังจากการหมัก 3 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียสและภายหลังเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสอีก 4 วัน พบว่าทุกกลุ่มทดลองมีความชื้นสูง โดยมีค่า Aw ที่ 0.97 ตลอดการหมักและเก็บรักษา เป็นเพราะลักษณะการผลิตที่บรรจุในไส้พลาสติก ภายหลังจาก 3 วันของการหมัก ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกไม่แตกต่างกัน และตรวจสอบไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *Salmonella* ในแหนมทั้งที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อและที่ใช้กล้าเชื้อ โดยรวมแหนมจะมีปริมาณ Coliforms

ลดลงภายหลังการหมัก โดยแหนมที่ใช้กล้าเชื้อทางการค้า (*Pacovis* RCI – 47) และกล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 มีแนวโน้มให้ปริมาณ Coliforms ที่ต่ำกว่าการหมักตามธรรมชาติ ขณะที่ทุกกลุ่มทดลองมี Yeast and mold ลดลงจากในวันที่ผลิต แต่ยังคงมีปริมาณที่มากกว่ากำหนดของ มผช. 470/ 2548 คือ 2 log CFU/g โดยพบว่าแหนมที่เติม *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 มีปริมาณ Yeast and mold ต่ำกว่าแหนมกลุ่มอื่นๆ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากแหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

สำหรับคุณภาพด้านสี พบว่าแหนมที่ใช้กล้าเชื้อต่างประเทศมีแนวโน้มให้สีที่ผิวนอกซีด (สว่างและเหลืองมากกว่า แดงน้อยกว่า) กว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ ($P<0.05$) ขณะที่หลังการหมัก 3 วัน แหนมที่ใช้ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 และ Sb 2 มีสีที่ผิวนอกแดงกว่าแหนมที่หมักตามธรรมชาติ ($P<0.05$) แต่ภายหลังเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน ทั้งกลุ่มที่ใช้ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 และ Sb 2 และที่ใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ต่างก็มีสีที่ผิวนอกแดงกว่า ($P<0.05$) แหนมที่หมักตามธรรมชาติ

ในด้านค่าความแข็ง (Hardness) ของเนื้อสัมผัสของแหนม พบว่าหลังการหมัก 3 วัน แหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อมีค่า Hardness มากกว่าทุกกลุ่มทดลอง ($P<0.05$) ขณะที่กลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันในค่า Hardness ($P>0.05$) แต่เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน พบว่าแหนมที่หมักตามธรรมชาติ ยังคงมีค่า Hardness มากกว่าทุกกลุ่มทดลอง ($P<0.05$) ขณะที่แหนมที่เติม *P. pentosaceus* TISTR 536 มีค่า Hardness ต่ำกว่าแหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ($P<0.05$)

การศึกษาความชอบของผู้บริโภคให้ผลในด้านสีค่อนข้างสอดคล้องกับการวัดด้วยเครื่องมือ คือ ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านสีของแหนมจากกลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อทางการค้า และกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ($P<0.05$) ขณะที่คะแนนความชอบด้านสีของแหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2, *P. pentosaceus* TISTR 536, และ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 ไม่แตกต่างจากแหนมที่หมักตามธรรมชาติ แต่แหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีข้อจำกัดในด้านความเปรี้ยว ซึ่งได้คะแนนความชอบต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ($P<0.05$) โดยรวมแหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 และ Sb 2 มีคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยว กลิ่นแหนม รสชาติแหนม และลักษณะโดยรวมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) แต่กล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb 2 ให้ผลดีกว่าแหนมที่หมักตามธรรมชาติ และที่ใช้กล้าเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P 2 ในการควบคุม Yeast and mold ($P<0.05$) จึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นกล้าเชื้อผลิตแหนมโค อย่างไรก็ตาม จากการที่ค่า pH ของแหนมเนื้อโคยังคงมีค่าสูงกว่า 4.6 ภายหลังการหมักเป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นการยืดเวลาการหมักให้เพิ่มขึ้นอีก 1-2 วัน หรือการใช้ glucono-delta-lactone เป็นส่วนประกอบอาจช่วยให้ค่า pH ลดลงถึงระดับที่ปลอดภัยมากขึ้น

ตอนที่ 3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเปรี้ยวกึ่งแห้งแบบกึ่งตะวันตกที่มีการเติมกล้าเชื้อนำเข้า มีการศึกษาแบ่งเป็น 2 โครงการ ได้แก่

3.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อโคพื้นเมืองหมักกึ่งแห้งแบบกึ่งตะวันตก ซึ่งมีการดำเนินโครงการเป็น 2 ตอน คือ

3.1.1 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อโคพื้นเมืองหมักกึ่งแห้งในรูปแบบเนื้อเค็มกึ่งตะวันตก (Beef Snack Sticks หรือ Slim Jims) โดยใช้กระบวนการผลิตแบบตะวันตก มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาสูตรสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อโคหมักแบบแห้งหรือกึ่งแห้งในรูปแบบเนื้อเค็มกึ่งตะวันตก 2) ศึกษากระบวนการหมักและบ่มที่เหมาะสมสำหรับผลิตเนื้อโคหมักแบบแห้งหรือกึ่งแห้งแบบกึ่งตะวันตก และ 3) ศึกษาคุณภาพเบื้องต้นทางเคมี และจุลินทรีย์ ของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น

ทำการศึกษาเบื้องต้นโดยผลิต Slim jims โดยใช้สูตรแบบอเมริกัน (สูตรฝรั่ง) สูตรรสจัด และสูตรหม่ำของไทย บรรจุในไส้ Collagen ขนาด 19 มิลลิเมตร มัดเป็นแท่งยาวประมาณ 6 นิ้ว_นำเข้าหมักและบ่มในตู้บ่มที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ กระบวนการผลิตโดยสังเขปประกอบด้วยการหมัก การให้ความร้อน และการบ่มเพื่อลดความชื้นที่อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่ต่ำลง

จากการตรวจสอบคุณภาพ พบว่า slim jims สูตรตะวันตกและสูตรหม่ำมีคุณสมบัติเบื้องต้นที่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์ dry หรือ semi-dry sausage ได้ และการเพิ่มช่วงเวลาในการหมักให้นานกว่า 17 ชั่วโมง อาจช่วยลดค่า pH และความชื้นลงได้ดีขึ้น สำหรับสูตรรสจัด พบว่าผลิตภัณฑ์มีผิวสัมผัสค่อนข้างเหนียว (case hardening) เนื่องจากการระบายความชื้นจากภายในและที่พื้นผิวของไส้กรอกไม่สัมพันธ์กัน ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องถึงการหมักที่เกิดขึ้นไม่เต็มที่

สำหรับการใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในเวลา 2 ชั่วโมง ภายหลังการหมัก เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการผลิต อาจลดโอกาสการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ซึ่งการใช้ความร้อนที่ระดับต่างๆ ในการผลิตไส้กรอกหมักมีปฏิบัติกันในสหรัฐอเมริกา แต่การใช้ความร้อนสูงถึง 70 องศาเซลเซียสอาจไม่เหมาะสำหรับการผลิตไส้กรอกแบบ probiotic ซึ่งหากมีจุลินทรีย์กรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็น probiotic และสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 70 องศาเซลเซียสจะเกิดทั้งประโยชน์และความปลอดภัย อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไปอาจลดอุณหภูมิในการให้ความร้อนลงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียสซึ่งกล้าเชื้อ เช่น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ยังสามารถเจริญและผลิต bacteriocin ได้

3.1.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อโคพื้นเมืองหมักกึ่งแห้งแบบกึ่งตะวันตก: หม่ำแท่งทานเล่นกึ่งแห้ง (Semi-dry Mum Snack Stick) มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) พัฒนาและศึกษาคุณภาพเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์จากเนื้อโคพื้นเมืองประเภทหมักแบบแห้งหรือกึ่งแห้งในรูปแบบกึ่งตะวันตก (หม่ำแท่งกึ่งแห้ง) ที่ผลิตโดยประยุกต์ใช้กระบวนการผลิตไส้กรอกกึ่งแห้งแบบตะวันตก เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์ 2) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสาร bacteriocins และมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็น probiotic เปรียบเทียบกับการหมักโดยใช้กล้าเชื้อของต่างประเทศ (Pacovis RCI-47) และการหมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ ต่อคุณภาพเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ และ 3) เพื่อศึกษาความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์

จากข้อมูลเบื้องต้นใน 3.1.1 จึงใช้สูตรหม่ำ เพื่อศึกษาในส่วนนี้ และลดอุณหภูมิในการให้ความร้อนอยู่ที่ 60 ซึ่งเป็นอุณภูมิสูงสุดที่คิดว่ากล้าเชื้ออาจจะยังมีชีวิตอยู่ ผลการศึกษาพบว่า หม่ำแท่งที่พัฒนาขึ้นโดย