

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อไก่โดยการล้างด้วยน้ำประปา น้ำโอโซน และสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายคลอรีนในรูปแบบแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อไก่

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำโอโซน ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อไก่

ส่วนที่ 2 การล้างเนื้อไก่ด้วยน้ำประปา สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ น้ำโอโซน และสารละลายกรดแลกติกต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 การล้างเนื้อไก่ด้วยน้ำประปา สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ น้ำโอโซน และสารละลายกรดแลกติกต่อเชื้อจุลินทรีย์และคุณภาพเนื้อไก่

การทดลองที่ 2 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* บนเนื้อไก่โดยการล้างด้วยน้ำประปา สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ น้ำโอโซน และสารละลายกรดแลกติก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างเนื้อไก่

เนื้อหน้าอกไก่และเนื้อไก่ที่ซื้อจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร นำเนื้อไก่บรรจุถุงพลาสติกที่สะอาดและแช่น้ำแข็งระหว่างนำมายังห้องปฏิบัติการ

2. เชื้อมาตรฐาน *S. aureus* และ *E. coli* ได้จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

3. อุปกรณ์

- เครื่องทำโอโซน (ENALY model O3 generator)

- เครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Hunter Lab รุ่น MiniScan, Japan)
- เครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Instron model 3344)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven ; Memmert model CM 500, Germany)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto clave ; Hirayama, Japan)
- ตู้เป่าเชื้อแบบ Laminar Flow (Dwyer model Mark II, USA)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (WTB Binder model BD, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath ; Memmert, Germany)
- เครื่องชั่งแบบดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Tanita model 1144, Tanita Corporation,

Japan)

- เครื่องชั่งแบบดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex ; Vision Scientific co., ltd. model KMC-1300V, Korea)

ไมโครปิเปต ขนาด 200-1000 ไมโครลิตร

- เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น

4. สารเคมี

- Peptone (Merck, Germany)
- Plate Count Agar (Merck, Germany)
- Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST) (Biomark, India)
- Brilliant Green Bile Broth (BGLB) (Biomark, India)
- *Eschericia coli* Broth (EC Broth) (Biomark, India)
- Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar) (Biomark, India)
- Tryptophan Broth (Merck, Germany)
- สารละลาย Kovac (Merck, Germany)
- Methyl Red - Voges Proskauer Broth (MR-VP) (Merck, Germany)
- α -Naphthol ความเข้มข้น 5 % (Merck, Germany)
- Potassiumhydroxide (KOH) ความเข้มข้น 40 % (Merck, Germany)
- Simmon's Citrate Agar (Merck, Germany)
- Chromocult (Merck, Germany)
- Agar (Criterion, USA)

- Baird Parker (BP; Merck, Germany)
- Potassium Tellulite Trihydrate (Merck, Germany)
- Tryptic soy broth (Merck, Germany)
- สารละลาย Kovac (Merck, Germany)
- กรดแลกติก (L (+) Lactic acid) ระดับความเข้มข้น 80 % (PURAC 80, 80 %
PURAC Biochem, Gorinchem, Netherlands)
- Sodium hypochlorite
- แอลกอฮอล์ 95 %

วิธีการดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้ออกไก่โดยการล้างด้วยน้ำประปา น้ำไอโซน และสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายคลอรีนในรูปแบบแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้ออกไก่

ตัวอย่างเนื้ออกไก่

แบ่งเนื้ออกไก่ ออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มควบคุม (ไม่จุ่มในสารละลาย)

กลุ่มที่ 2 : จุ่มในน้ำประปา

กลุ่มที่ 3 : จุ่มในสารละลายคลอรีน 50 ppm

กลุ่มที่ 4 : จุ่มในสารละลายคลอรีน 100 ppm

กลุ่มที่ 5 : จุ่มในสารละลายคลอรีน 150 ppm

กลุ่มที่ 6 : จุ่มในสารละลายคลอรีน 200 ppm

สารละลายคลอรีนใช้ในรูปแบบผงปูนคลอรีนนำมาละลายน้ำ : การเตรียมสารละลายคลอรีนผงปูนคลอรีน ใส่น้ำ 3 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำส่วนที่ใส่น้ำใช้

1. ผงปูนคลอรีน 0.25 กรัม น้ำกลั่น 3 ลิตร ความเข้มข้น 50 ppm
2. ผงปูนคลอรีน 0.50 กรัม น้ำกลั่น 3 ลิตร ความเข้มข้น 100 ppm
3. ผงปูนคลอรีน 0.75 กรัม น้ำกลั่น 3 ลิตร ความเข้มข้น 150 ppm
4. ผงปูนคลอรีน 1.00 กรัม น้ำกลั่น 3 ลิตร ความเข้มข้น 200 ppm

วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างเนื้อมากจากตลาดสด แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม แล้วตรวจหาจุลินทรีย์เริ่มต้น โดยการสุ่มตัวอย่างเนื้อมากมาตัวอย่างละ 25 กรัม ซึ่งการสุ่มจะสุ่มทั่วทั้งชิ้นเนื้อมาก จากนั้นนำเนื้อมากมาล้างด้วยน้ำที่แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม (ไม่จุ่ม) กลุ่มที่ 2 จุ่มด้วยน้ำประปา กลุ่มที่ 3 - 6 จุ่มด้วยสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ppm ตามลำดับ โดยการจุ่มตัวอย่างเนื้อมากในน้ำดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำชิ้นให้สะเด็ดน้ำ 10 นาที แล้วสุ่มเนื้อมากแต่ละกลุ่มมาตรวจเชื้อจุลินทรีย์หลังการจุ่มด้วยน้ำดังกล่าวอีกครั้ง ซึ่งการสุ่มจะสุ่มบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่สุ่มก่อนนำมาล้าง สุ่มมาตัวอย่างละ 25 กรัม แล้วนำเนื้อมากแต่ละกลุ่มบรรจุภาชนะปิด ใช้ฟิล์มพลาสติกปิดทับและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 3 วัน เพื่อเก็บตัวอย่างไว้ศึกษาด้านจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (Psychrotropic bacteria) โคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform) โคลิฟอร์มที่พบในมูล (Fecal coliform) และ อีโคไล (*E. coli*) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และศึกษาด้านคุณภาพ ได้แก่ การทดสอบความพึงพอใจด้านสี ด้านกลิ่น ด้านเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้ประเมินที่ไม่ผ่านการฝึก 36 คน

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายคลอรีนในรูปแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อมาก

1. ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

ตัวอย่างเนื้อมากซื้อจากตลาดสด ในกรุงเทพมหานคร นำเนื้อมากจากตลาดมาห้องปฏิบัติการทันที ใช้เวลาประมาณ 20 นาที แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มควบคุม (ไม่ได้จุ่มในสารละลาย)

กลุ่มที่ 2 : จุ่มน้ำประปา

กลุ่มที่ 3 : จุ่มน้ำไอโซน 5 ppm

กลุ่มที่ 4 : จุ่มน้ำไอโซน 10 ppm

การใช้น้ำไอโซน : การเตรียมไอโซน

น้ำกลั่น 5 ลิตร เป็นระยะเวลา 3 นาที ความเข้มข้น 5 ppm

น้ำกลั่น 2.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 3 นาที ความเข้มข้น 10 ppm

โดยมีการวิเคราะห์ดูปริมาณการลดเชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count), Psychrotropic bacteria, Total coliforms, fecal coliforms และเชื้อ *E. coli*

ขั้นตอนการทดลอง

การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อไก่โดยการจุ่มด้วยน้ำประปา น้ำโอโซน

แบ่งเนื้อไก่ออกเป็น 4 กลุ่ม ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น จากนั้นนำเนื้อไก่จุ่มด้วยน้ำซึ่งแบ่งเป็นการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่จุ่ม) กลุ่มที่ 2 จุ่มด้วยน้ำประปา กลุ่มที่ 3 จุ่มด้วยน้ำโอโซนที่ 5 ppm กลุ่มที่ 4 จุ่มด้วยน้ำโอโซนที่ 10 ppm โดยจุ่มเนื้อไก่ในน้ำดังกล่าวให้ท่วมชิ้นเนื้อ 5 นาที ล้างเช่นเดียวกัน 2 ครั้ง จากนั้น นำชิ้นจากน้ำฝั่งให้สะเด็ดน้ำ 10 นาที นำเนื้อไก่แต่ละกลุ่มแบ่งบรรจุถาดโฟม 2 ถาด ถาดละประมาณ 100 กรัม ใช้แผ่นพลาสติกปิดทับและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 และ 3 วัน เพื่อเก็บตัวอย่างไว้ศึกษาด้านจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ โคลิฟอร์มทั้งหมด โคลิฟอร์มที่พบในมูล และ *E. coli* และ ด้านคุณภาพเนื้อ ได้แก่ การทดสอบความพึงพอใจด้านสีโดยใช้คนประเมินที่ไม่ผ่านการฝึก 36 คน

ส่วนที่ 2 การล้างเนื้อไก่ด้วยน้ำประปา สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ น้ำโอโซน และสารละลายกรดแลกติกต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและคุณภาพเนื้อไก่

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 การล้างเนื้อไก่ด้วยน้ำประปา สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ น้ำโอโซน และสารละลายกรดแลกติกต่อเชื้อจุลินทรีย์และคุณภาพเนื้อไก่

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างเนื้อไก่

ตัวอย่างเนื้อไก่ติดหนังจากตลาดสดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ในช่วงเช้าเวลา 6.00 น. นำเนื้อไก่จากตลาดมาห้องปฏิบัติการทันที ใช้เวลาประมาณ 20 นาที แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มควบคุม (ไม่ได้จุ่มสารละลาย)

กลุ่มที่ 2 : จุ่มน้ำประปา

กลุ่มที่ 3 : จุ่มน้ำโอโซน ความเข้มข้น 100 ppm

กลุ่มที่ 4 : จุ่มสารละลายกรดแลกติก ความเข้มข้น 2%

กลุ่มที่ 5 : จุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 200 ppm

การเตรียมน้ำ

1.1 การเตรียมน้ำโอโซน 100 ppm : น้ำกลั่น 2.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 30 นาที

$$100 \text{ ppm} / 2.5 \text{ L} = 30 \text{ นาที}$$

$$1 \text{ ppm} = 0.3 \text{ นาที}$$

1.2 การเตรียมสารละลายกรดแลกติก ความเข้มข้น 2% : น้ำกลั่น 2,437.5 มิลลิลิตร เติม
สารละลายกรดแลกติก 62.5 มิลลิลิตร (สารละลายกรดแลกติก ความเข้มข้น 80% ของบริษัท MERCK)

$$\begin{aligned} \text{จากความเข้มข้น 80\% } C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 80 (V_1) &= 2 \times 2,500 \\ V_1 &= (2 \times 2,500) / 80 \\ V_1 &= 62.5 \text{ ml} / 2,500 \text{ ml} \end{aligned}$$

1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 200 ppm : น้ำกลั่น 2,493
มิลลิลิตร เติมคลอรีน 7.14 มิลลิลิตร (สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 70,000 ppm ของ
บริษัท Carlo erba)

$$\begin{aligned} \text{จากความเข้มข้น 70,000 ppm } C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 70,000 (V_1) &= 200 \times 2,500 \\ V_1 &= (200 \times 2,500) / 70,000 \\ V_1 &= 7.14 \text{ ml} / 2,500 \text{ ml} \end{aligned}$$

2. การยับยั้งปริมาณจุลินทรีย์ในเนื้อม่องไก่โดยใช้น้ำประปา สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์
ความเข้มข้น 200 ppm น้ำไอโซน ความเข้มข้น 100 ppm และสารละลายกรดแลกติก 2%

แบ่งเนื้อม่องไก่ออกเป็น 5 กลุ่ม ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น จากนั้นนำเนื้อม่องไก่จุ่มด้วยน้ำซึ่งแบ่งกา
ทดลองเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่จุ่มสารละลาย) กลุ่มที่ 2 จุ่มด้วยน้ำประปา กลุ่มที่ 3
จุ่มด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 200 ppm กลุ่มที่ 4 จุ่มด้วยน้ำไอโซน ความ
เข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่ 5 จุ่มด้วยสารละลายกรดแลกติก ความเข้มข้น 2% โดยจุ่มเนื้อม่องไก่ในน้ำดังกล่าว
ให้ท่วมชิ้นเนื้อ 5 นาที จากนั้น นำชิ้นจากน้ำผึ่งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที นำเนื้อไก่แต่ละกลุ่มแบ่งบรรจุถาด
โฟม 3 ถาด ถาดละ 6 น่อง ใช้แผ่นพลาสติกปิดทับและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา
0 วัน 3 วัน และ 5 วัน เพื่อเก็บตัวอย่างไว้ศึกษาด้านจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ โค
ลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* และด้านคุณภาพเนื้อ ได้แก่ ทดสอบความพึงพอใจด้านสี กลิ่น และ
ความชอบโดยรวม โดยใช้คนประเมินจำนวน 50 คนขึ้นไป

การทดลองที่ 2 การยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* บนเนื้อไก่โดยการล้างด้วยน้ำประปา สารละลาย
โซเดียมไฮโปคลอไรท์ น้ำไอโซน และสารละลายกรดแลกติก

นำเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth เป็นเวลาข้ามคืน
นำมาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^7
cfu/ml จากนั้นนำเนื้อไก่จุ่มในเชื้อบริสุทธิ์ ให้เนื้อสัมผัสกับเชื้อทั้งสองด้านโดยการพลิกชิ้นเนื้อกลับไป

มา (Podolak *et al.*, 1996) ทิ้งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบเชื้อเริ่มต้นภายหลังการจุ่มเนื้อในเชือบริสุทธิ์ จากนั้น แบ่งเนื้อไก่เป็น 5 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมคือไม่ผ่านการล้าง กลุ่มที่ 2-5 คือการล้างด้วยน้ำประปา (วัดปริมาณคลอรีนที่หลงเหลือ) น้ำไอโซน สารละลายกรดแลคติกและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยจุ่มเนื้อไก่ในน้ำดังกล่าวให้ท่วมชิ้นเนื้อทิ้งไว้ 5 นาที ล้างเช่นเดียวกัน 2 ครั้ง จากนั้น นำชิ้นจากน้ำผึ่งให้สะเด็ดน้ำ 10 นาที นำเนื้อไก่แต่ละกลุ่มแบ่งบรรจุถาดโฟม 3 ถาด ถาดละ 100 กรัม ใช้ฟิล์มพลาสติกปิดทับและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 3 และ 5 วัน เพื่อเก็บตัวอย่างไว้ศึกษาด้านจุลินทรีย์

ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

1. การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total bacterial count)

สุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ ตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยสารละลาย peptone ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย peptone ที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลากการบ่มเนื้อ จากนั้นดูดสารละลาย peptone ที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้าย ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร plate count agar ลงจานเพาะเชื้อ ปริมาตรจานละ 15–20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็ง แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี (AOAC, 2006)

2. การศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychotropic bacteria)

สุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ ตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยสารละลายเปปโตน ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย peptone ที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลากการบ่มเนื้อ จากนั้นดูดสารละลาย peptone ที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้าย ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร plate count agar ลงจานเพาะเชื้อ ปริมาตรจานละ 15–20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน นำมานับจำนวนโคโลนีทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี (Diliello, 1982)

3. การศึกษา Total Coliform Bacteria, Fecal Coliforms Bacteria และ *E. coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN) อ้างอิงวิธี AOAC (2006)

3.1 การศึกษาโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform bacteria)

นำสารละลาย Peptone ที่ใช้ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่ความเข้มข้น 1:10, 1:100 และ 1:1000 โดยดูดสารละลาย Peptone ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตรถ่ายลงในหลอดทดลองซึ่งภายในมีหลอดดักก๊าซและบรรจุอาหาร LST ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 หลอด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจผล หลอดของตัวอย่างใดมีก๊าซเกิดขึ้นภายในหลอดดักก๊าซ บันทึกผลเป็น + แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่ ภายในมีหลอดดักก๊าซซึ่งมีอาหาร BGLB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจผล หลอดของตัวอย่างใดมีก๊าซเกิดขึ้นภายในหลอดดักก๊าซ บันทึกผลเป็น + และรายงานผลเป็นจำนวนที่ตรวจพบได้มากที่สุด (Most probable numbers, MPN) (AOAC. 2006)

3.2 การศึกษาโคลิฟอร์มในมูล (Fecal coliform bacteria)

ถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นภายในหลอดดักก๊าซของหลอดที่บรรจุอาหาร LST ลงในหลอดทดลองภายในมีหลอดดักก๊าซซึ่งมีอาหาร EC Broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45.5 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจผล หลอดของตัวอย่างใดมีก๊าซเกิดขึ้นภายในหลอดดักก๊าซ บันทึกผลเป็น + และรายงานผลเป็น MPN (AOAC. 2006)

3.3 การศึกษาอีโคไล (*E. coli*)

นำหลอดที่มีอาหาร EC Broth ซึ่งมีก๊าซเกิดขึ้นไปทำการ streak plate ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร EMB Agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจผล จานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *E. coli* อยู่จะมีสีม่วง-ดำ เกิดขึ้นบนที่กผลเป็น + และรายงานผลเป็น MPN (AOAC. 2006)

การศึกษาอีโคไลด้วยการทดสอบ Indole, MR, VP, Citrate (IMViC test)

ทำตามวิธีการของ AOAC (2006) โดยนำจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *E. coli* มาเก็บโคโลนีเดี่ยวจำนวน 2 โคโลนี และถ่ายลงใน Plate Count Agar slant หลอดละ 1 โคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบแบ่งออกเป็น

3.3.1 การทดสอบ Indole โดยการถ่ายเชื้อจากอาหาร Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan Broth แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Kovac จำนวน 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้าให้ผล + จะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนของ Tryptophan Broth

3.3.2 การทดสอบ Methyl Red และ Acetoin (MR-VP) โดยการถ่ายเชื้อจากอาหารใน Plate

Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้

- สำหรับ MR ให้เติมสารละลาย Methyl Red 2-3 หยด ลงในสารละลายเชื้อประมาณ 2 มิลลิลิตร ผล + จะเกิดสีแดง

- สำหรับ VP ให้ถ่ายเชื้อประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม 0.1 มิลลิลิตรของ 5% α -Naphthol ลงในสารละลายแอลกอฮอล์ และ 40 % ของสารละลาย KOH ลงไป ผสมทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผล + จะให้สีชมพูแดง

3.3.3 การทดสอบ citrate ทำการถ่ายเชื้อใส่อาหาร Simmon's Citrate Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผล + จะให้สีน้ำเงิน

4. การศึกษาจำนวน Total Coliform Bacteria และ *E. coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult อ้างอิงวิธี AOAC (2006)

สุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ ตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย peptone ที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลากการบ่มเนื้อ จากนั้นดูดสารละลาย peptone ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ ลงบนอาหาร Chromocult ที่เทไว้ ด้วยวิธีการ spread plate technique แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีที่มีสีชมพูแสดงว่าเป็น โคลิฟอร์มแบคทีเรีย ส่วนโคโลนีสีม่วงน้ำเงินแสดงว่าเป็น *E. coli* จากนั้นเพื่อยืนยันว่าเป็น *E. coli* ให้สุ่มโคโลนีสีม่วงน้ำเงิน เชียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan Broth บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Kovac จำนวน 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้าให้ผล + จะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนของ Tryptophan Broth และนับจำนวนโคโลนีที่เกิด

5. การศึกษา *S. aureus* (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

สุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ ตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย peptone ที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลากการบ่มเนื้อ จากนั้นดูดสารละลาย peptone ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ ลงบนอาหาร Baird Parker Medium + Egg yolk ที่เทไว้ ด้วยวิธีการ spread plate technique แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูโคโลนีที่มีสีดำและมีตะกอนขุ่นสีเหลือง (opaque zone) ไปทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดอาหาร BHI 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่ 35-37 องศา

เซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นหยด rabbit plasma 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอด BHI นำไปบ่ม 4-6 ชั่วโมง อ่านผลโดยการแข็งตัวของพลาสมาอันเนื่องมาจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *S. aureus* ผลิต

6. วัดค่าสีของเนื้อ

วัดสีในพื้นที่ด้านนอกของเนื้อไก่ที่สัมผัสกับสารที่ใช้ล้าง ก่อนทำการวัดสีด้วยเครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Hunter Lab รุ่น MiniScan EZ) เก็บข้อมูลทุกระยะเวลาของการเก็บรักษาเนื้อ บันทึกค่า L^* , a^* และ b^*

7. การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา (% drip loss)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเนื้อบดก่อนเก็บรักษาเป็นน้ำหนักเริ่มต้น(D1) บรรจุเนื้อบดลงในภาชนะแล้วนำไปบ่มที่ 2-4 °C นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (D2) (Stolowski *et al.* 2006) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาได้จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{การวัดค่าการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา} = ((D1-D2) \times 100) / D1$$

8. การหาความนุ่มของเนื้อโดยวิธีวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler shear force; WBSF) โดยวิธีการของ Van Moeseke and De Smet (1999)

8.1 ตัดชิ้นเนื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดประมาณ 2 × 3 นิ้ว หนา 1 นิ้ว

8.2 นำก้อนเนื้อไปบรรจุในถุงสุญญากาศ แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิใจกลางก้อนเนื้อเป็น 71 องศาเซลเซียส

8.3 นำเนื้อไปทำให้เย็นที่โดยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกจากถุง

8.4 นำเนื้อมาทำการตัดด้วยมีดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด กว้าง × ยาว × หนา เท่ากับ 1×3×1 cm (ตัดตามแนวยาวเส้นใยกล้ามเนื้อ) อย่างน้อยตัวอย่างละ 10 ชิ้น

8.5 นำไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่อง Instron model 3344 หัววัด Warner-Bratzler shear และบันทึกผลค่าแรงเฉือนสูงสุดในหน่วย N

9. การทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านสีและลักษณะทั่วไปของเนื้อไก่

โดยทำการทดสอบความพึงพอใจทางด้านสี ด้านกลิ่น ด้านความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้ทดสอบ ซึ่งเป็นกลุ่มนักศึกษา อาจารย์ และผู้บริโภคทั่วไป มีช่วงการให้คะแนน จากช่วงคะแนน 1 (ไม่ชอบมาก) ถึง 5 (ชอบมาก) ซึ่งผู้ทดสอบสามารถวิจารณ์หรือเสนอแนะความคิดเห็นที่มีต่อผลิตภัณฑ์ได้

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติทางด้านประสาทสัมผัสของเนื้อไก่วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) แล้วนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ซึ่งสามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์