วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาผลของการจุ่มน้ำคลอรีนต่อปริมาณแบคทีเรียในเนื้อปลาแล่

1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ residual chlorine ต่อปริมาณแบคทีเรียในเนื้อปลาแล่

1.1.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลา

ซื้อปลานิลและปลาดุกมีชีวิตขนาดตัวละ 500-600 และ 250-350 กรัม ตามลำดับ ชนิดละ 15 กิโลกรัม/ซ้ำ จากร้านค้าปลามีชีวิตแห่งหนึ่ง ในตลาดสดเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ลำเลียงปลามายังห้องปฏิบัติการและทำให้ตายอย่างรวดเร็วโดยแช่ปลาในน้ำประปาผสมน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นขอดเกล็ด (เฉพาะปลานิล) ตัดหัว ควักไส้ และล้างให้สะอาดโดยใช้น้ำดื่ม (โคลาริส, ขอนแก่น) ที่เย็นจัดอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการแล่เฉพาะเนื้อที่มีหนังติดอยู่ ได้เนื้อปลาแต่ละชนิดประมาณ 5 กิโลกรัม จากนั้นล้างเนื้อปลาในน้ำดื่มเย็นจัดอีก 2 ครั้ง สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 15 นาทีในตู้เย็น ทำการแบ่งเนื้อปลาแต่ละชนิดเป็น 5 ส่วนๆ ละ 1 กิโลกรัม แช่ตู้เย็นไว้และใช้ทดลองภายใน 2 ชั่วโมง

1.1.2 การเตรียมน้ำคลอรีนและการจุ่มชิ้นปลาในน้ำคลอรีน

ใช้สารคลอรีนผงที่ใช้สำหรับทำน้ำประปา ซึ่งมี sodium hypochlorite ร้อยละ 65 โดยน้ำหนัก (อินเตอร์วอเตอร์ทรีตเมนต์, ขอนแก่น) ละลายคลอรีนผงในน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ residual chlorine โดยวิธี Iodometric I ตาม American Public Health Association (1981) เมื่อทราบปริมาณ residual chlorine จึงเจือจางน้ำนี้โดยผสมน้ำดื่มคุณภาพน้ำบริโภคจนมี residual chlorine ความเข้มข้น 100, 200, และ 300 ppm. ใช้เนื้อปลานิลและเนื้อปลาดุกจุ่มในน้ำคลอรีนที่มีความเข้มข้นของ residual chlorine ระดับต่างกัน เป็นเวลา 2 นาที โดยกลุ่ม positive control คือชิ้นปลาที่ผ่านการจุ่มน้ำดื่ม (โครลาลิส, ขอนแก่น) สำหรับ negative control คือชิ้นปลาที่ไม่จุ่มในน้ำชนิดใดเลย ตัวอย่างเนื้อปลาที่เป็นกลุ่มควบคุมและเนื้อปลาที่ผ่านการจุ่มน้ำคลอรีนที่มี residual chlorine ความเข้มข้นต่างๆ จะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณ mesophilic และ psychrptrophic bacteria รวมทั้งประเมินคะแนนกลิ่นโดยใช้วิธีทางประสาทสัมผัส จากนั้นเลือกความเข้มข้นเพียง 1 ความเข้มข้นที่ให้ผลในการลดปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด และทำให้เกิดผลเชิงลบต่อคะแนนทางประสาทสัมผัสของกลิ่นน้อยที่สุด

1.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียและการประเมินทางประสาทสัมผัส

1.1.3.1 psychrotrophic bacteria วิเคราะห์ตามวิธีของ American Public Health Association (2001) โดยชั่งเนื้อปลาที่ตัดด้วยมีดฆ่าเชื้อ 25 กรัม ใส่ใน sterilized peptone water (เข้มข้นร้อยละ 0.1) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher 3500 Jumbo (Seward Laboratory Systems Inc., Bohemia,

NY, USA) 60 วินาที วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียใน plate count agar (BBL, Sparks, MD, USA) โดยใช้เทคนิค pour plate บ่มเชื้อที่ 7±1 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

1.1.3.2 mesophilic bacteria วิเคราะห์ตามวิธีของ American Public Health Association (2001) ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่บ่มเชื้อที่ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

1.1.3.3 การประเมินทางประสาทสัมผัส ใช้การประเมินความชอบ/การยอมรับของกลิ่นในปลาดิบ โดยใช้ 9-point verbal hedonic scale ตามตามที่ปรากฏใน Meilgaard et al. (1999) โดยใช้ผู้ทดสอบ 12 คน โดยคะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (dislike extremely), 2 = ไม่ชอบมาก (dislike very much), 3 = ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately), 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly), 5 = เฉยๆ (neither like or dislike), 6 = ชอบเล็กน้อย (like slightly), 7 = ชอบปานกลาง (like moderately), 8 = ชอบมาก (like very much), และ 9 = ชอบมากที่สุด (like extremely)

1.1.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) โดยแปรผันความเข้มข้นของ residual chlorine 4 ระดับ คือ 0 ppm. (positive control และ negative control), 100 ppm., 200 ppm., และ 300 ppm. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียและการประเมินทางประสาทสัมผัสมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS version 9 ที่ความน่าจะเป็นร้อยละ 95 การจำแนกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยใช้วิธี least significant level (LSD) ตามคำแนะนำของ Milliken and Johnson (1997)

1.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการจุ่มน้ำคลอรีนต่อปริมาณแบคทีเรียในเนื้อปลาแล่

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลา

ซื้อปลานิลและปลาดุกมีชีวิตขนาดตัวละ 500-600 และ 250-350 กรัม ตามลำดับ ชนิดละ 12 กิโลกรัม/ซ้ำ จากร้านค้าปลามีชีวิตแห่งหนึ่ง ในตลาดสดเขตอำเภอเมือง จังหวัดเราะห์ขอนแก่น ลำเลียงปลามายังห้องปฏิบัติการและทำให้ตายอย่างรวดเร็วโดยแช่ปลาในน้ำประปาผสมน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นขอดเกล็ด (เฉพาะปลานิล) ตัดหัว ควักไส้ และล้างให้สะอาดโดยใช้น้ำดื่ม (โคลาริส, ขอนแก่น) ที่เย็นจัดอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการแล่เฉพาะเนื้อที่มีหนังติดอยู่ ได้เนื้อปลาแต่ละชนิดประมาณ 4 กิโลกรัม จากนั้นล้างเนื้อปลาในน้ำดื่มเย็นจัดอีก 2 ครั้ง สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 15 นาทีในตู้เย็น ทำการแบ่งเนื้อปลาแต่ละชนิดเป็น 4 ส่วนๆ ละ 1 กิโลกรัม แช่ตู้เย็นไว้และใช้ทดลองภายใน 2 ชั่วโมง

1.2.2 การเตรียมน้ำคลอรีนและการจุ่มชิ้นปลาในน้ำคลอรีน

ใช้สารคลอรีนผงที่ใช้สำหรับทำน้ำประปา ซึ่งมี sodium hypochloride ร้อยละ 65 โดยน้ำหนัก (อินเตอร์วอเตอร์ทรีตเมนต์, ขอนแก่น) ละลายคลอรีนผงในน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ residual chlorine โดยวิธี Iodometric I ตาม American Public Health Association (1981) เมื่อทราบปริมาณ residual chlorine จึงทำการเจือจางน้ำนี้โดยผสมน้ำดื่มคุณภาพน้ำบริโภคจนมี residual chlorine ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งได้ผลการทดลองจากข้อ 1.1 ใช้เนื้อปลานิลและเนื้อปลาดุกจุ่มในน้ำคลอรีนความเข้มข้นนี้เป็นเวลา 0 (negative control ไม่มีการจุ่มเนื้อปลาในน้ำเปล่าหรือน้ำคลอรีน), 1, 2, และ 3 นาที ปลาที่ผ่านการจุ่มน้ำคลอรีนที่ระยะเวลาต่างๆ จะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณ mesophilic และ psychrptrophic bacteria รวมทั้งให้คะแนนทางประสาทสัมผัสของกลิ่น โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 จากนั้นเลือกระยะเวลาในการจุ่มเพียง 1 ระยะเวลาที่ให้ผลในการลดปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดและทำให้เกิดผลเชิงลบต่อคะแนนทางประสาทสัมผัสน้อยที่สุด

1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียและการประเมินทางประสาทสัมผัส

ใช้วิธีเดียวกับการทดลองที่ 1.1

1.2.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) โดยแปรผันระยะเวลาในการจุ่ม 4 ระดับ คือ คือ 0, 1, 2, และ 3 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียและการประเมินทางประสาทสัมผัส มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS version 9 ที่ความน่าจะเป็นร้อยละ 95 การจำแนกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยใช้วิธี least significant level (LSD) ตามคำแนะนำของ Milliken and Johnson (1997)

2. การศึกษาผลของ lactic acid bacteria ชนิด *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ต่อคุณภาพและความปลอดภัยของเนื้อปลานิลและปลาดุก

2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลา

ซื้อปลานิลและปลาดุกมีชีวิตขนาดตัวละ 400-500 และ 250-350 กรัม ตามลำดับ ชนิดละ 18 กิโลกรัม/ซ้ำ จากร้านค้าปลามีชีวิตแห่งหนึ่ง ในตลาดสดเขตอำเภอเมือง จังหวัดเราะห์ขอนแก่น ลำเลียงปลามายังห้องปฏิบัติการและทำให้ตายอย่างรวดเร็วโดยแช่ปลาในน้ำประปาผสมน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นขอดเกล็ด (เฉพาะปลานิล) ตัดหัว ควักไส้ และล้างให้สะอาดโดยใช้น้ำดื่ม (โคลาริส, ขอนแก่น) ที่เย็นจัดอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการแล่เฉพาะเนื้อที่มีหนังติดอยู่ ได้เนื้อปลาแต่ละชนิดประมาณ 6 กิโลกรัม จากนั้นล้างเนื้อปลาในน้ำดื่มเย็นจัดอีก 2 ครั้ง จุ่มเนื้อปลาในน้ำคลอรีนที่มีความเข้มข้นของ residual

chlorine และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อลดปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น โดยใช้ผลจากการทดลองจากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2 สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 15 นาทีในตู้เย็น ทำการแบ่งเนื้อปลาแต่ละชนิดเป็น 12 ส่วนๆ ละ 0.5 กิโลกรัม นำเนื้อปลาแต่ละส่วนใส่ถุงสุญญากาศทำจากพลาสติกชนิด polyamine/LLDPE หนา 15/65 ไมครอน ขนาด 23x33 เซนติเมตร (วรรณประไพ อินเตอร์เนชันเนล จำกัด, สมุทรปราการ) ซึ่งมี oxygen permeability เมื่อวิเคราะห์ที่ความดัน 1 บรรยากาศ (atm), ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) ร้อยละ 75, อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 38.03 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ตารางเมตร สุ่มแบ่งเนื้อปลาทั้ง 12 ถุง เป็นกลุ่ม (กลุ่มละ 6 ถุง) เพื่อใช้เติมเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* จำนวน 6 ถุง และใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* อีก 6 ถุง ระหว่างที่รอการเติมเชื้อและปิดผนึกถุง ต้องเก็บถุงไว้ในตู้เย็น

2.2 การเตรียมและการเติมเชื้อ ในเนื้อปลานิลและเนื้อปลาคุกแล่

เลี้ยงเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ) ใน MRS broth (BBL, Sparks, MD, USA) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 34 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงแยกเชื้อ แล้วจึงล้างด้วยน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เติมเชื้อในเนื้อปลาปริมาณประมาณ 6 log cfu/g จนครบ 6 ถุง จากนั้นนวดถุงด้วยมือ 1 นาที เพื่อให้เชื้อกระจายตัวทั่วถุง ส่วนเนื้อปลาอีก 6 ถุง ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม เติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรเท่ากับที่เติมในถุงที่มีเชื้อ แล้วจึงนวดถุงด้วยมือ 1 นาทีเช่นเดียวกับกลุ่มตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ จากนั้นดูดอากาศออกจากถุงและปิดผนึกภายใต้สภาพสุญญากาศโดยใช้เครื่อง DZ400/500 vacuum packer (Goldenware Machinery Co., Ltd., China) เก็บเนื้อปลาในถุงสุญญากาศทั้ง 6 ถุงในลังโฟม เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัย ในวันที่ 0, 4, 8, 12, 16, และ 20

2.3 การวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของเนื้อปลาที่ผ่านการเติมเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย

2.3.1.1 การวิเคราะห์ psychrotrophic bacteria วิเคราะห์ตามวิธีของ American Public Health Association (2001) โดยชั่งเนื้อปลาที่ตัดด้วยมีดฆ่าเชื้อ 25 กรัม ใส่ใน sterilized peptone water (เข้มข้นร้อยละ 0.1) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher 3500 Jumbo (Seward Laboratory Systems Inc., Bohemia, NY, USA) 60 วินาที วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียใน plate count agar (BBL, Sparks, MD, USA) โดยใช้เทคนิค pour plate บ่มเชื้อที่ 7±1 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.1.2 การวิเคราะห์ mesophilic bacteria วิเคราะห์ตามวิธีของ American Public Health Association (2001) ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3.1.1 แต่บ่มเชื้อที่ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ตามวิธีของ Tharmaraj and Shah (2003) ใช้เนื้อปลาที่ผ่านการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1.1 เพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (BBL, Sparks, MD, USA) ที่ผ่านการปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้อยู่ระหว่าง 4.58-5.20 บ่มเชื้อที่ 45±1 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ภายใต้สภาพไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar (BBL, Sparks, MD, USA) และเพิ่มการกำจัดออกซิเจนใน anaerobic jar โดยใช้ BD BBL™ Gaspak™ Anaerobic System Envelopes (BBL, Sparks, MD, USA) อีกทางหนึ่ง ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.1.4 การวิเคราะห์ coliforms วิเคราะห์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด violet red bile (VRB) agar (BBL, Sparks, MD, USA) โดยใช้เทคนิค pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับโคโลนีสีม่วงแดง (purple-red) มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตร และมีตะกอนของ bile acid รอบโคโลนีตาม American Public Health Association (2001) ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.1.5 การวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ใช้วิธีตาม American Public Health Association (2001) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด bismuth sulfite agar (BBL, Sparks, MD, USA) ใช้เทคนิค spread plate และบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนับ typical colony ที่มีลักษณะสีดำหรือเขียวที่มีลักษณะมันเงา (metallic sheen) และอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีมีสีดำหรือน้ำตาล จากนั้นเขี่ย typical colony และ streak บน plate count agar บ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และทำ Gram stain เพื่อดูการย้อมติดสีและลักษณะของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นยืนยันว่า typical colony เป็น *Salmonella* spp. ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยใช้ชุดตรวจสอบ API 20E (bioMerieux Vitek, Inc., Hazewood, MO, USA) ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.1.6 การวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ใช้วิธีตาม American Public Health Association (2001) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (BBL, Sparks, MD, USA) ใช้เทคนิค spread plate และบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนับและเขี่ย typical colony ที่มีลักษณะค่อนข้างแบน ผิวเรียบ สีเหลือง และ streak บน plate count agar บ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และทำ Gram stain เพื่อดูการย้อมติดสีและลักษณะของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ตามด้วยการบ่งชี้ว่า typical colony เป็น *V. cholerae* หรือไม่ ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยใช้ชุดตรวจสอบ API 20E (bioMerieux Vitek, Inc., Hazewood, MO, USA) ปริมาณโคโลนีที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.1.7 การวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ใช้วิธีตาม American Public Health Association (2001) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Baird-Parker base agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbia, India) ที่เติม egg yolk tollurite emulsion (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbia, India) ใช้เทคนิค spread plate บ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนับและเขี่ย typical colony ที่มีลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ สีดำหรือเทาดำ มีวงขุ่นรอบโคโลนี และ streak บน plate count agar บ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และทำ Gram stain เพื่อดูการย้อมติดสีและลักษณะของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ตามด้วยการบ่งชี้ว่า typical colony เป็น *S. aureus* หรือไม่ ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยใช้ชุดตรวจสอบ API Stap (bioMerieux Vitek, Inc., Hazewood, MO, USA) ปริมาณโคโลนีที่นับได้รายงานผลเป็น log cfu/g

2.3.2 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส ใช้การประเมินความชอบ/การยอมรับของกลิ่นในปลาดิบ โดยใช้ 9-point verbal hedonic scale ตามที่ปรากฏใน Meilgaard et al. (1999) โดยใช้ผู้ทดสอบ 10 คน โดยคะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (dislike extremely), 2 = ไม่ชอบมาก (dislike very much), 3 = ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately), 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly), 5 = เฉยๆ (neither like or dislike), 6 = ชอบเล็กน้อย (like slightly), 7 = ชอบปานกลาง (like moderately), 8 = ชอบมาก (like very much), และ 9 = ชอบมากที่สุด (like extremely)

2.3.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเนื้อปลา ใช้วิธีของ Chiou and Huang (2004) ผสมเนื้อปลาในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ออก โดยใช้ในอัตราส่วน 1: 10 โดยน้ำหนัก ปั่นเป็นเวลา 30 วินาที วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย Sartorius PP-150 pH meter (Sartorius Corp., Edgewood, NY, USA)

2.3.4 การวิเคราะห์ทางเคมี วิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base-TVB) ใช้เทคนิค Conway micro-diffusion ของ Subramanian (2007) เตรียมสารสกัดกุ้งโดยผสม 20%trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กับ 5%TCA ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน ตามด้วยตัวอย่างกุ้งบดปริมาณ 20 กรัม แล้วจึงปั่นให้ละเอียด เสร็จแล้วกรองเศษกุ้งออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นบรรจุสารสกัดที่ได้ในลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 5%TCA

เตรียมสาร inner ring solution เริ่มจากเตรียม mixed indicator solution โดยละลาย bromocresol green ปริมาณ 0.01 กรัม และ methyl red ปริมาณ 0.02 กรัม ใน ethanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำ mixed indicator solution ทั้งหมดละลายใน ethanol 200 มิลลิลิตร แล้วเติม boric acid ปริมาณ 10 กรัม แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นดูดสาร inner ring solution ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงชั้นในของจาน Conway แล้วจึงดูดสารสกัดกุ้งปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงชั้นนอกของจาน Conway

จากนั้นเติมสาร saturated potassium carbonate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในวงชั้นนอกของจาน Conway แล้วปิดฝาจาน Conway ทันที แล้วเก็บจาน Conway ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นไตรเตรท inner ring solution ด้วย hydrochloric acid ที่มีความเข้มข้น 0.01 N ในวงชั้นในของจาน Conway จนกระทั่งสีเขียวหายไป แล้วใช้ 5%TCA แทนสารสกัดกุ้งเป็น blank คำนวณปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดจากสูตร

ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (มิลลิกรัมไนโตรเจน/ 100 กรัม) = [14 x N x (VS-VB) x 25 x 100] / w

VS = ปริมาณ hydrochloric acid ที่ใช้ไตรเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

VB = ปริมาณ hydrochloric acid ที่ใช้ไตรเตรท blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของ hydrochloric acid (N)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) จัดทรีทเมนต์แบบ 2x6 factorial arrangement รวมทั้งหมด 12 ทรีตเมนต์ โดยปัจจัยทำการศึกษา คือ การเติมเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2 ระดับ [ปริมาณ 0 cfu/g (ชุดควบคุม) และการเติมเชื้อ 6 log cfu/g] และระยะเวลาในการเก็บรักษา 6 ระดับ (0, 4, 8, 12, 16, และ 20 วัน) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของเนื้อปลา มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS version 9 ที่ความน่าจะเป็นร้อยละ 95 การจำแนกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยใช้วิธี least significant level (LSD) ตามคำแนะนำของ Milliken and Johnson (1997)