บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

(1) สัตว์ทดลองและการจดบันทึกรูปร่างภายนอก

การศึกษาครั้งนี้ใช้ไก่คอล่อนและไก่พื้นเมือง เพศผู้และเพศเมีย ที่มีขนาดน้ำหนักตัวเท่ากับ 1.3 1.5 และ 1.8 กิโลกรัม จำนวน 180 ตัว โดยจัดไก่วิเคราะห์โดยวิธีแฟกตอเรียล ภายใต้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (2 x 2 x 3 factorial in complete randomised design) (สุรพล, 2528ก) สำหรับรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองและการบันทึกข้อมูลต่างๆ มีดังนี้

1.1 สายพันธุ์

ในการสุ่มจับไก่คอล่อนและไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงโดยเกษตรกร ได้กำหนดให้พิจารณาลักษณะรูปร่างภายนอกของไก่เป็นสำคัญ (แสดงในภาคผนวกที่ 3) ดังนี้

1.1.1 **ไก่คอล่อน** : พิจารณาคัดเลือกไก่คอล่อนที่มีรูปร่างภายนอกดังต่อไปนี้ คือ หงอนถั่ว ช่วงคอถึงกระเพาะพักไม่มีขนปกคลุม ลำตัวมีรูปทรงไก่ชน ขนลำตัวสีดำหรือสีเขียวดำ โดยยอมให้มีขนสีน้ำตาลแดงหรือขาวแซมบ้าง และมีหน้าแข้งสีเหลือง

1.1.2 **ไก่พื้นเมือง** : พิจารณาคัดเลือกไก่พื้นเมืองที่รูปร่างภายนอกเช่นเดียวกับไก่ชนเป็นสำคัญ

1.2 น้ำหนักตัว

ในการสุ่มจับไก่ทั้งสองสายพันธุ์ได้กำหนดช่วงน้ำหนักไก่ที่จับไว้ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนไก่คอล่อนและไก่พื้นเมืองที่สุ่มจับเพื่อทำการศึกษาวิจัย

น้ำหนักที่กำหนด	น้ำหนักตัวที่สุ่มจับจริง	ไก่คอล่อน			ไก่พื้นเมือง		
		เพศผู้	เพศเมีย	รวม	เพศผู้	เพศเมีย	รวม
1.3 กิโลกรัม	1.15 – 1.35 กิโลกรัม	15	15	30	15	15	30
1.5 กิโลกรัม	1.45 – 1.65 กิโลกรัม	15	15	30	15	15	30
1.8 กิโลกรัม	1.75 – 1.95 กิโลกรัม	15	15	30	15	15	30
รวมทั้งสิ้น				90			90

1.3 การจดบันทึกลักษณะรูปร่างภายนอก

ทำการบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะภายนอก ได้แก่ ความกว้าง-ยาวของหงอน ความกว้าง-ยาวของกะโหลก ความยาวของส่วนคอ ปีก รอบอก ความกว้าง-ยาว-ลึกของลำตัว keel pubis lateral pub-lateral ขนาดของทวาร ความยาวช่วงขา รอบแข้ง และความยาวแข้ง ตามวิธีการของ วรวิทย์ และคณะ (2546)

(2) การฆ่า และการชำแหละซาก

ทำการฆ่าและชำแหละซากไก่ทั้งหมด โดยมีขั้นตอนในการดำเนินการ คือ อดอาหารไก่แต่ให้น้ำ เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมงก่อนฆ่า จากนั้นจึงทำการฆ่าตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก รัตนา และนิรัตน์ (2542) โดยการเชือดคอตรง jugular vein และปล่อยให้เลือดไหลออกจากตัวประมาณ 3 - 4 นาที แล้วจุ่มซากลงในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 68 องศา เซลเซียส นานประมาณ 2 นาที จากนั้นจึงนำซากไก่ไปถอนขนด้วยเครื่องถอนขนไก่แบบอัตโนมัติชนิด rotary drum picker นานประมาณ 25 วินาที แล้วนำมาถอนขนอ่อนด้วยมือ ล้างซากด้วยน้ำสะอาด จากนั้นจึงทำการเปิดซากเอาเครื่องในออก แล้วตัดแยกซากออกเป็นชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ ส่วนอก (breast) สะโพก (thigh) น่อง (drumstick) ปีก (wing) และโครงร่าง (skeletal frame) ซึ่งรวมทั้งส่วนปอด ไต หน้าแข้งและเท้า บันทึกน้ำหนักของชิ้นส่วนซาก จากนั้นจึงทำการชำแหละชิ้นส่วนซากโดยแยกเนื้อ ไขมัน กระดูก และหนังออกจากกัน

สำหรับการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อไว้ทำการวิเคราะห์นั้น ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อส่วนอก (*Pectoralis major*) และส่วนสะโพก (*Biceps femoris*) จากไก่ทั้งสองสายพันธุ์กล้ามเนื้อละ 5 ชิ้น/ ช่วงน้ำหนักตัว/ เพศ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงการจัดการตัวอย่างเนื้อไก่ที่สุ่มเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้านต่างๆ

ชนิดของการวิเคราะห์	ชนิดของตัวอย่างที่สุ่มเก็บ	จำนวนที่สุ่มเก็บ	การจัดการตัวอย่าง
1. น้ำหนักซาก และ น้ำหนักชิ้นส่วนซาก		เก็บจากทุกซาก	ชั่งน้ำหนัก
2. ความเป็นกรดและด่าง	บริเวณกล้ามเนื้อ *semimembranosus*	เก็บจากทุกซาก	วัดค่าความเป็นกรดและด่างขณะยังไม่ทำการตัดแยกซาก
3. ประเมินสีของเนื้อ	ส่วนอก (*Pectoralis major*)	5	นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 3 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์ภายในเวลา 4 ชั่วโมง
	ส่วนสะโพก (*Biceps femoris*)	5	
	หนังไก่ส่วนอก	5	
	หนังไก่ส่วนสะโพก	5	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ชนิดของการวิเคราะห์	ชนิดของตัวอย่างที่สุ่มเก็บ	จำนวนที่สุ่มเก็บ	การจัดการตัวอย่าง
4. คุณค่าทางโภชนะ (nutritive values)	ส่วนอก (*Pectoralis major*) ส่วนสะโพก (*Biceps femoris*)	5 5	นำไปบดละเอียดและบรรจุไว้ในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทไธลีน (polyethylene) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำวิเคราะห์ต่อไป
5. ไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล และกรดไขมัน	ส่วนอก (*Pectoralis major*) ส่วนสะโพก (*Biceps femoris*)	5 5	นำไปบดละเอียดและบรรจุไว้ในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทไธลีน (polyethylene) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำวิเคราะห์ต่อไป

สำหรับข้อมูลที่ทำการจดบันทึกและนำมาวิเคราะห์ในด้านต่างๆ มีดังนี้

2.1 การเก็บข้อมูลด้านกายภาพ

2.1.1 น้ำหนักซากตัดแต่งเมื่อคิดเป็นร้อยละ (dressing percentage)

$$\%\text{น้ำหนักซาก} = \frac{\text{น้ำหนักซากเย็น}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100 \qquad [1]$$

หมายเหตุ น้ำหนักซากเย็น (chilled carcass weight) หมายถึง น้ำหนักของซากหลังจากผ่านขั้นตอนการแช่เย็น (chill) ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.2 น้ำหนักอวัยวะต่างๆ เมื่อคิดเป็นร้อยละ

คิดน้ำหนักอวัยวะส่วนต่างๆ เทียบเป็นร้อยละของน้ำหนักมีชีวิต ดังนี้

2.1.2.1 น้ำหนักของอวัยวะภายนอกเมื่อคิดเป็นร้อยละ (external organ percentage)

$$\%\text{อวัยวะภายนอก} = \frac{\text{น้ำหนักของอวัยวะนอก}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100 \qquad [2]$$

2.1.2.2 น้ำหนักของอวัยวะภายในเมื่อคิดเป็นร้อยละ (internal organ percentage)

$$\%\text{อวัยวะภายใน} = \frac{\text{น้ำหนักของอวัยวะใน}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต}} \times 100 \quad [3]$$

2.1.3 น้ำหนักชิ้นส่วนตัดแต่งเมื่อคิดเป็นร้อยละ (retail cut percentage)

$$\%\text{ชิ้นส่วนตัดแต่ง} = \frac{\text{น้ำหนักของชิ้นส่วนตัดแต่ง}}{\text{น้ำหนักซากเย็น}} \times 100 \quad [4]$$

2.1.4 การหาค่าความเป็นกรดและด่างของเนื้อ (pH)

ทำการวัดค่า pH ที่ชั่วโมงแรกที่สัตว์ตาย (ไม่เกิน 45 นาที : pH_0) และ pH สุดท้าย (ultimate pH [pH_{24}]) วัดในชั่วโมงที่ 24 หลังฆ่า โดยวัดตรงส่วนของสะโพกที่บริเวณกล้ามเนื้อ *semimembranosus* ด้วยเครื่อง Portable ISFET pH meter Model ARGUS โดยใช้ probe รุ่น Red-Line LanceFET ของบริษัท Sentron ประเทศเนเธอร์-แลนด์

2.1.5 การประเมินค่าสีของเนื้อ และหนัง

ทำการตรวจวัดค่าสีของกล้ามเนื้อทั้งด้านหน้า (anterior) และด้านหลัง (posterior) ประเมินหาค่าเฉลี่ยของสีเนื้อและสีของหนังสดจากส่วนอกและส่วนสะโพก ด้วยเครื่อง HunterLab color meter รุ่น ColorFlex ของบริษัท Hunter Associates Laboratory Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกาโดยการสุ่มหยิบชิ้นเนื้อและหนังมาตำแหน่งละ 5 ตัวอย่าง/ช่วงน้ำหนักตัว/สายพันธุ์/เพศ ทั้งนี้โดยรายงานค่าที่ประเมินได้ในระบบ CIE (Complete International Commission on Illumination) โดยจำแนกค่าสี (colour profile) ออกเป็น ค่า L* (lightness) ค่า a* (redness) และค่า b* (yellowness) ตามลำดับ

2.1.6 ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ

2.1.6.1 ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อระหว่างการเก็บ (drip loss)

ทำการสุ่มเนื้อสดส่วนอกและส่วนสะโพก 5 ตัวอย่าง/สายพันธุ์/เพศ/ช่วงน้ำหนักตัว/ชนิดของเนื้อ ทำการซับให้แห้ง จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดความกว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1.5 x 3.0 x 0.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักของเนื้อ นำไปวางลงบนกระดาษกรอง คลุมด้วยถุงพลาสติก จากนั้นจึงนำไปวางไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่ง

น้ำหนัก และนำมาคำนวณหาค่าการสูญเสียน้ำโดยคิดเป็นร้อยละ ดังแสดงในสมการที่ [5]

$$\%\text{การสูญเสียน้ำในระหว่างการเก็บ} = \frac{(\text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 1} - \text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 2})}{\text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 1}} \times 100 \qquad [5]$$

2.1.6.2 ค่าการสูญเสียน้ำเนื่องจากการทำให้ (cooking loss)

สุ่มเนื้อส่วนอกและส่วนสะโพก จำนวน 5 ตัวอย่าง/สายพันธุ์/เพศ/ช่วงน้ำหนักตัว/ชนิดของเนื้อ มาตัดให้มีขนาด กว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1.5 x 3.0 x 0.5 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปบรรจุไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทชนิดทนความร้อน (poly-bag zipper) แล้วนำไปต้มให้สุกในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำเย็นจนมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำตัวอย่างเนื้อออกจากถุงพลาสติก ซับด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 หลังจากนั้นจึงนำไปชั่งน้ำหนัก แล้วนำน้ำหนักทั้งสองค่ามาคำนวณโดยคิดเทียบเป็นร้อยละของการสูญเสีย ตามสูตรคำนวณในสมการที่ [6])

$$\%\text{การสูญเสียน้ำเนื่องจากการประกอบอาหาร} = \frac{(\text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 1} - \text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 2})}{\text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 1}} \times 100 \qquad [6]$$

หมายเหตุ เนื้อที่ผ่านการชั่งน้ำหนักเพื่อหาค่าการสูญเสียน้ำเนื่องจากการประกอบอาหารจะนำไปตรวจวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่อไป

2.1.6.3 ค่าการสูญเสียน้ำในเนื้อเมื่อทำการละลาย (thawing loss)

สุ่มเนื้อส่วนอกและส่วนสะโพกจำนวน 5 ตัวอย่าง/สายพันธุ์/เพศ/ช่วงน้ำหนักตัว/ชนิดของเนื้อ จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดกว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1.5 x 3.0 x 0.5 เซนติเมตร ทำการชั่งน้ำหนัก แล้วจึงไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทำละลายโดยเก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่ง

น้ำหนัก จากนั้นจึงนำน้ำหนักที่ได้ไปเปรียบเทียบกับน้ำหนักเนื้อที่ชั่งครั้งแรกก่อนแช่แข็งโดยคิดเป็นร้อยละ (สมการที่ [7])

$$\%\text{การสูญเสียน้ำหลังจากการแช่แข็ง} = \frac{(\text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 1} - \text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 2})}{\text{น้ำหนักเนื้อชั่งครั้งที่ 1}} \times 100 \qquad [7]$$

2.1.7 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force)

สุ่มหยิบชิ้นเนื้อสดส่วนอก (breast muscle) และส่วนสะโพก (thigh) มากล้ามเนื้อละ 5 ตัวอย่าง/สายพันธุ์/เพศ/ช่วงน้ำหนักตัว/ชนิดของเนื้อ ตัดให้ชิ้นขนาดกว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 1.0 x 2.0 x 0.5 เซนติเมตร ทำการชั่งน้ำหนัก แล้วบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทชนิดทนความร้อน (poly-bag zipper) นำไปต้มในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นจึงทำให้เนื้อมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องโดยการแช่น้ำเย็น แล้วจึงนำเนื้อมาตัดแต่งให้มีขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) ประมาณ 1.0 x 2.0 x 0.5 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปตรวจวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i ของบริษัท Stable Micro System ประเทศ สหราชอาณาจักร โดยใช้ใบมีดชนิด Warner Brazler shear blade (WB-blade) โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของใบมีด (cross head speed) เท่ากับ 2 มม./วินาที ตามวิธีการของ Dawson et al. (1991 ซึ่งดัดแปลงโดย Wattanachant et al., 2004)

2.2 การเก็บข้อมูลด้านเคมี

2.2.1 คุณค่าทางโภชนะ (nutritive value)

สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะ ได้แก่ ปริมาณความชื้น (moisture) โปรตีน (crude protein) ไขมัน (crude fat หรือ ether extract) และเถ้า (ash) ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (1990)

2.2.2 ไขมันรวม (total fat) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) กรดไขมัน (fatty acid) และคอเลสเตอรอล (cholesterol)

2.2.2.1 ไขมันรวม

ไขมันทั้งหมดในเนื้อไก่ถูกสกัดออกมาตามวิธีของ (Folch et al., 1957 ซึ่งอ้างถึงโดย Christie, 1993) ทั้งนี้โดยทำการชั่งตัวอย่างเนื้อไก่ในปริมาณ 50 กรัม ใส่ลงในขวดกลม (round bottom flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม

chloroform : methanol (อัตรา 2:1 v/v) ลงไป 60 มล. คนให้เข้ากันด้วย Stirrer ใช้ใบตี (stirring shaft) ชนิด propeller ด้วยความเร็ว 800 รอบ/นาที จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman filter paper เบอร์ 1) ลงไปใน separating funnel จากนั้นล้างไขมันที่ยังคงติดค้างอยู่ที่ส่วนกากที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่งด้วย chloroform : methanol (2:1) ต่อจากนั้นเติมน้ำกลั่น 0.2 เท่าของสารละลายที่กรองได้ แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนล่างของสารละลายใน separating funnel นำไประเหยแห้งด้วย water bath 70^{0}C แล้วจึงนำน้ำมันที่หลังจากระเหยแล้วไปชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันรวมต่อไป จากนั้นจึงนำไปละลายด้วย chloroform : methanol (2:1) ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 50 มก./มล. เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และคอเลสเตอรอลต่อไป

2.2.2.2 ไตรกลีเซอร์ไรด์

การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ครั้งนี้ใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฮปเทน (heptane extraction method) ตามวิธีการของ Biggs et al. (1975) โดยนำน้ำมันที่ได้จากสกัดหาไขมันรวม (ในข้อ 2.2.2.1) มาแยกเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันด้วย extracting solvent (ประกอบด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) และเฮปเทน) ที่ปรับสภาพให้เป็นกรดด้วยกรดกำมะถัน (sulfuric acid) จากนั้นจะใช้สารละลายโซเดียมเมทตาเพอริโอเดท (sodium meta-periodate) เปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นฟอร์มาดีไฮด์ โดยจะไปรวมตัวกับไดอะ-เซทิล (diacetyl) และแอมโมเนีย (ammonia) ให้สาร substituted lutidine จากนั้นนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโมเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-1201

2.2.2.3 กรดไขมัน

สำหรับการวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมัน (fatty acid) ของเนื้อส่วนอกและส่วนสะโพกของเนื้อไก่คอล่อนและไก่พื้นเมืองนั้น ตัวอย่างน้ำมันจะถูกทำให้อยู่ในรูปเมททิลเอสเทอร์ (methyl ester) วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณตามวิธีของ Morrison and Smith (1964 ซึ่งดัดแปลงโดย Rajion, 1985)

ชนิดของกรดไขมันจะถูกนำมาจำแนกโดยวิธีการแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) โดยใช้เครื่อง Perkin Elmer Autosystem รุ่น XL ของบริษัท Perkin-Elmer Corporation เมือง Norwalk ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้คอลัมน์ชนิด PERMABOND-FFAP DF-0.25 fused-silica capillary column ขนาด 0.25 มิลลิเมตร x 25 เมตร ของบริษัท Macherey-Nagel ประเทศเยอรมันนี โดยตรวจวัดแบบ FID (flame ionization detector) มี split ratio ขนาด 100:1 โดยกำหนดให้ injector มีอุณหภูมิเท่ากับ 245 องศาเซลเซียส และกำหนดให้ตัวตรวจวัด (detector temperature) มีอุณหภูมิเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส และกำหนดให้ใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ 2 ระดับ คือ 150 และ 215 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้แก๊สนำ (carrier gas) เป็นแก๊สฮีเลียม กำหนดให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มล./นาที (15 psi) และเลือกใช้กรดโนนาดีคาโนอิก (nonadecanoic acid [C19:0]) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็น internal standard ตามเทคนิคของ Joseph and Ackman (1992)

2.2.2.4 คอเลสเตอรอล

การวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอลในเนื้อไก่ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค ferric perchlorate method ตามวิธีการของ Jung et al. (1975) โดยการนำน้ำมันที่ได้จากการสกัดในข้อ 2.2.2.1 มาแยกคอเลสเตอรอลออกจากไลโป-โปรตีนด้วยการต้มกับสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ในแอลกอฮอล์ (33% alcoholic KOH) จากนั้นสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) แล้วเก็บสารละลายส่วนมาทำปฏิกิริยาสารเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride reagent) โดยคอเลสเตอรอลจะทำปฏิกิริยากับเฟอริกไอออน (ferric ion) เมื่อต้มกับกรดกำมะถันและเอทธิลอะซิเตท (ethylacetate) ให้สีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-1201

2.2.3 คอลลาเจน (collagen)

ทำการศึกษาปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด (total collagen) ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (insoluble collagen) และปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen) ของตัวอย่างเนื้อไก่ส่วนอกและส่วนสะโพก ที่สุ่มมาจำนวน 5 ตัวอย่าง/ช่วงน้ำหนักตัว/สายพันธุ์/เพศ

2.2.3.1 ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด (total collagen)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด ดำเนินการโดยนำเนื้อไก่ทั้งส่วนอกและส่วนสะโพกที่สุ่มมาจำนวน 0.5 กรัม/ตัวอย่าง ไปบดละเอียด จากนั้นนำไปย่อย (hydrolyzed) ด้วยกรดเกลือ (6 N HCl) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Palka (1999 ซึ่งดัดแปลงโดย Wattanachant et al., 2004) จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการย่อยไปทำให้ใสด้วยผงถ่าน (active carbon) แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman filter paper No. 4) แล้วทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ระดับความเข้มข้น 10 โมล และ 1 โมล ตามลำดับ จากนั้นนำไปปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) โดยโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ตามวิธีการของ Bergman and Loxley (1963) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนโดยการคูณด้วยค่าคงที่ 7.25 (Liu et al., 1996) แล้วรายงานเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดต่อน้ำหนักตัวอย่างเนื้อ

2.2.3.2 ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (soluble collagen)

สำหรับการหาปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ ดำเนินการตามเทคนิคที่อธิบายโดย Liu et al. (1996) ทั้งนี้โดยนำเนื้อไก่ส่วนอกและส่วนสะโพกที่บดละเอียดและทราบน้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 2.0 กรัม) มาผสมกับสารละลายริงเจอร์ (25% Ringer's solution) ในปริมาตร 8 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 4) ทำการโฮโมจีไนซ์ จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส 70 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงขนาด 5,000 x g นานประมาณ 30 นาที แยกส่วนใสและส่วนตะกอน โดยนำส่วนตะกอนไปโฮโมจีไนซ์ด้วยสารละลายริงเจอร์ซ้ำอีกครั้ง แล้วปั่นแยก จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้จากปั่นเหวี่ยงไปย่อยด้วยกรดเกลือ (6 N HCl) ที่ความร้อน 110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง นำมาทำให้ใสและทำให้เป็นกลางเช่นเดียวกับการหาปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด (ในข้อ 2.2.3.1) ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ตามวิธีการของ Bergman and Loxley (1963) แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนโดยการคูณด้วยค่าคงที่ 7.25 ปริมาณคอลลาเจนที่ได้จะเป็นปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลายมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อเนื้อหนึ่งกรัม จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณ

คอลลาเจนที่ละลายด้วยไปหักลบกับปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย (ดังสมการที่ [8])

$$\text{ปริมาณคอลลาเจนที่ละลายได้ (\% ต่อปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด)} = \frac{(\text{ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด} - \text{ปริมาณคอลลาเจนที่ไม่ละลาย}) \, 100}{\text{ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมด}} \quad [8]$$

2.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เป็นการประเมินคุณลักษณะของเนื้อไก่คอล่อน และไก่พื้นเมือง เปรียบเทียบกับไก่กระทงทั้งในรูปเนื้อสดและเนื้อสุก

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างไก่สด

เตรียมเนื้อไก่ทั้ง 13 ตัวอย่าง แยกเป็นเนื้อสองส่วนคือ เนื้ออก และเนื้อสะโพก โดยตัดแต่งส่วนที่เป็นมัน พังผืด และเอ็นออก ตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2 x 5 เซนติเมตร และเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นานไม่เกิน 48 ชั่วโมง หลังจากการฆ่า สำหรับการจัดตัวอย่างเนื้อไก่เพื่อใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงการจัดกลุ่มตัวอย่างเนื้อไก่ต่อชนิดกล้ามเนื้อเพื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ลำดับ	ประเภทของไก่	เพศ	น้ำหนัก (กก)	หมายเหตุ
1	ไก่คอล่อน	ผู้	1.3	เป็นเนื้อไก่สดที่เลาะมัน
2	ไก่คอล่อน	ผู้	1.5	พังผืด และเอ็นออก
3	ไก่คอล่อน	ผู้	1.8	ผ่านการแช่เย็นที่อุณหภูมิ
4	ไก่คอล่อน	เมีย	1.3	ประมาณ 4° เซลเซียส
5	ไก่คอล่อน	เมีย	1.5	ไม่เกิน 48 ชั่วโมงหลัง
6	ไก่คอล่อน	เมีย	1.8	จากฆ่า
7	ไก่บ้าน	ผู้	1.3	
8	ไก่บ้าน	ผู้	1.5	
9	ไก่บ้าน	ผู้	1.8	
10	ไก่บ้าน	เมีย	1.3	
11	ไก่บ้าน	เมีย	1.5	
12	ไก่บ้าน	เมีย	1.8	
13	ไก่กระทง	เมีย	1.5	ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3.2 การฝึกผู้ประเมิน

ใช้ผู้ประเมินที่ผ่านการฝึกฝนพอสมควรจำนวน 13 คน และ ผู้ประเมินสำรองอีกจำนวน 1 คน โดยการทำแบบประชุมโต๊ะกลม ในลักษณะการพิจารณ์กลุ่มเปิด (open discussion) เพื่อกำหนดคุณลักษณะโดยสังเขป และทำความเข้าใจในงานที่จะต้องประเมิน และนำผลการประชุมมาจัดทำแบบสอบถามเพื่อใช้ในการประเมินต่อไป

2.3.3 เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส

การศึกษาครั้งนี้ใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัสครั้งนี้ใช้เทคนิค Quantitative Descriptive Analysis (QDA) ตามวิธีการที่ระบุโดย Stone and Sidel (1993) โดยการทดสอบใน ไก่สดและไก่ต้มสุกจากเนื้อส่วนอกและส่วนเนื้อสะโพก

2.3.4 ข้อมูลที่เก็บ

ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสครั้งนี้มีข้อมูลที่ได้ทำการตรวจสอบแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ

2.3.4.1 ลักษณะของเนื้อไก่ดิบ (fresh) กำหนดให้ผู้ทดสอบดูสี ลักษณะของเนื้อ และดมกลิ่น

2.3.4.2 ลักษณะของเนื้อไก่ต้มสุก (cooking) กำหนดให้ผู้ทดสอบดูสี ลักษณะของเนื้อ และดมกลิ่นก่อนการทดสอบ จากนั้นจึงทำการตรวจชิมและอธิบายความรู้หลังจากการตรวจชิม สำหรับนิยามและความหมายของคำที่ใช้สอบถามในการตรวจชิมครั้งนี้ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการสอบถามผู้ชิม

ลำดับที่	คุณลักษณะที่ประเมิน	คำอธิบาย
1	Colour	สีของตัวอย่าง โดยการสังเกตโดยการมองเห็น โดยดูลักษณะสีอ่อน และสีเข้ม
2	Smell	กลิ่นของตัวอย่างรับรู้ได้โดยการดม
3	Flavor	กลิ่น รสไก่ต้มของตัวอย่างรับรู้ได้โดยการชิม
4	Sweetness	ความหวานของตัวอย่างหลังจากการเคี้ยว 5-7 ครั้ง
5	Off-flavour	กลิ่นแปลกปลอม หรือกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ อันเกิดจากการต้ม
6	Tenderness	ความนุ่มเหนียวของตัวอย่าง เป็นค่าการใช้แรงในความพยายามเคี้ยวตัวอย่าง
7	Juiciness	ความชุ่มฉ่ำ (ความฉ่ำน้ำ) ของตัวอย่าง เป็นลักษณะการที่มีน้ำออกจากตัวอย่างในขณะที่เคี้ยว

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	คุณลักษณะที่ประเมิน	คำอธิบาย
8	Fragment	ลักษณะการแตกออกตามความยาวเส้นใยกล้ามเนื้อ
9	Powdery	ลักษณะตัวอย่างหลังการเคี้ยว 12-15 ครั้ง ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายแป้ง
10	After taste flavor	กลิ่นไก่ของตัวอย่าง ที่ติดอยู่ในปากหลังการกลืนตัวอย่าง (ความรู้สึกหลังการชิม)
11	After taste sweetness	รสหวานของตัวอย่าง ที่ติดอยู่ในปากหลังการกลืนตัวอย่าง (ความรู้สึกหลังการชิม)
12	Off-flavour	กลิ่นแปลกปลอม หรือกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ อันเกิดจากการต้ม (ความรู้สึกหลังการชิม)
13	Overall acceptance	การยอมรับโดยรวมต่อตัวอย่าง

2.3.5 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบ

2.3.5.1 การทดสอบไก่สด โดยนำตัวอย่างออกจากห้องเย็น ตั้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จัดตัวอย่างในถ้วยพลาสติกและปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กำหนดหมายเลขประจำตัวอย่างและเสิร์ฟตัวอย่างที่จัดไว้ตามลำดับแบบสุ่ม

2.3.5.2 การทดสอบไก่สุก โดยนำตัวอย่างออกจากห้องเย็น ตั้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง และต้มไก่ในน้ำเดือด ครั้งและ 1 ตัวอย่าง นาน 2 นาที ซึ่งจะได้อุณหภูมิที่จุดกลางไม่น้อยกว่า 72 องศาเซลเซียส โดยเสิร์ฟตัวอย่างในถ้วยพลาสติกซึ่งปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กำหนดหมายเลขประจำตัวอย่างและเสิร์ฟตัวอย่างที่จัดไว้ตามลำดับแบบสุ่มโดยที่อุณหภูมิของตัวอย่างประมาณ 40 องศาเซลเซียส

2.4.2 การวางแผนการทดสอบทางประสาทสัมผัส

เนื่องจากข้อจำกัดของการทดสอบทางประสาทสัมผัสในการทดสอบครั้งนี้ คือ มีสิ่งทดลองทั้งหมด 13 สิ่งทดลอง ดังนั้นเพื่อลดข้อจำกัดของการทดลองและลดขนาดของการทดสอบทางประสาทสัมผัสจึงได้ใช้แผนการทดสอบ 2 x 2 x 3 แฟกทอเรียลในบล็อคไม่สมบูรณ์แบบสมดุลย์ (2 x 2 x 3 factorial in balanced incomplete block design, BIB) ใช้ไก่กระทงเป็นตัวเปรียบเทียบ (สุรพล, 2528ข) โดยมีรายละเอียดต่างๆ และผังการทดลองดังต่อไปนี้

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + A_j + B_k + C_l + AB_{jk} + AC_{jl} + BC_{kl} + ABC_{jkl} + e_{ijkl} \qquad [9]$$

เมื่อ Y_{ijkl} = ค่าสังเกตจากทรีทเมนต์ (combination) ที่ j k l บล็อกที่ i

μ = 0verall mean

P_i = อิทธิพลเนื่องจากบล็อกที่ระดับ i เมื่อ i = 1, 2,...,13 (b)

A_j = อิทธิพลเนื่องจากพันธุ์ไก่ (main effect A) ที่ระดับ j เมื่อ j = ไก่คอล่อน ไก่พื้นเมือง และไก่กระทง

B_k = อิทธิพลเนื่องจากเพศไก่ (main effect B) ที่ระดับ k เมื่อ k = ผู้ และเมีย

C_j = อิทธิพลเนื่องจากน้ำหนักตัวไก่ (main effect C) ที่ระดับ l เมื่อ l = 1.3 1.5 และ1.8 กิโลกรัม

AB_{jk} = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย A และ B (interaction AB) ที่ระดับ jk

AC_{jl} = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย A และ C (interaction AC) ที่ระดับ jl

BC_{kl} = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย B และ C (interaction BC) ที่ระดับ kl

ABC_{jkl} = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย A B และ C (interaction ABC) ที่ระดับ jkl

e_{ijkl} = ค่าความผิดพลาด (error) ที่เกิดขึ้น

โดย t = จำนวนทรีทเมนต์ (combination) (13)

b = จำนวนบล็อก (13)

r = จำนวนซ้ำ (4)

k = ขนาดบล็อก (4)

λ = 1 โดยมีผังการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงจัดกลุ่มและตัวเลขสุ่มเพื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส

บล็อก	ขนาดบล็อก			
	1	2	3	4
B 1	1	2	4	10
B 2	2	3	5	11
B 3	3	4	6	12
B 4	4	5	7	13
B 5	5	6	8	1
B 6	6	7	9	2
B 7	7	8	10	3

ตารางที่ 10 (ต่อ)

บล็อก	ขนาดบล็อก			
	1	2	3	4
B 8	8	9	11	4
B 9	9	10	12	5
B 10	10	11	13	6
B 11	11	12	1	7
B 12	12	13	2	8
B 13	13	1	3	9

(3) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยวิธี General Linear Model Procedure และวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรม SAS (1988)