

การทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตรา
การเจริญเติบโตของลิสทีเรีย โมโนไซโตจีเนสในเนื้อไก่ปรุงสุก



นางสาวเสาวลักษณ์ อรรถนิवास

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VALIDATION OF MATHEMATICAL MODEL FOR COMBINED EFFECT OF
TEMPERATURE AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATION ON THE GROWTH
RATE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN COOKED CHICKEN MEAT



Miss Saowalak Akkhanivad

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health

Department of Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับผลของอุณหภูมิ
และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญเติบโตของลิสเทอ
เรีย โมโนไซโตจีเนส ในเนื้อไก่ปรุงสุก

โดย

นางสาวเสาวลักษณ์ อรรคนิวาส

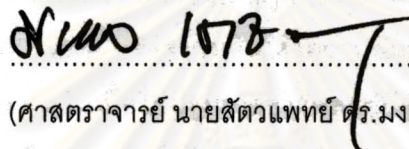
สาขาวิชา

สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต

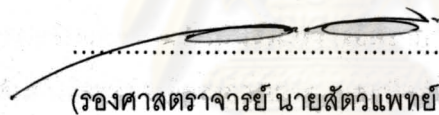
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

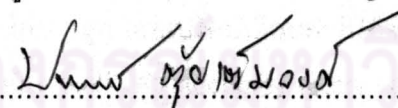
 คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อลงกร อมรศิลป์)

 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ)

 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

 กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเวทย์ ตูย์เต็มวงศ์)

เสาวลักษณ์ อรรถนิवास : การทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของลิสทีเรีย โมโนไซโตจีเนสในเนื้อไก่ปรุงสุก (VALIDATION OF MATHEMATICAL MODEL FOR COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATION ON THE GROWTH RATE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN COOKED CHICKEN MEAT)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ, 108 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายอัตราการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ที่สร้างจากข้อมูลการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยมีปัจจัยกระทบจากอุณหภูมิ (5-25 องศาเซลเซียส) ร่วมกับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2-10% w/w) ซึ่งสร้างเส้นโค้งความสัมพันธ์ และหาอัตราการเจริญจำเพาะของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุกของแต่ละคู่ปัจจัย ตามสมการของ Gompertz พบว่า อุณหภูมิร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่า R square อยู่ระหว่าง 0.885 ถึง 0.967 และค่า root mean square error (RMSE) อยู่ระหว่าง 0.02 ถึง 0.04 บ่งชี้ว่าค่าพารามิเตอร์ของสมการ Gompertz สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ และปัจจัยกระทบได้อย่างเหมาะสม จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ และปัจจัยกระทบทั้งสองสามารถนำมาประเมินหาค่าระดับอุณหภูมิต่ำสุด (T_{min}) และปริมาณน้ำใช้ได้ต่ำสุด ($a_{w\ min}$) ที่ *Listeria monocytogenes* สามารถเจริญได้ในเนื้อไก่ปรุงสุก เท่ากับ -0.7 องศาเซลเซียส (272.4 องศาเคลวิน) และ 0.902 ตามลำดับ และค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการความสัมพันธ์ คือ 0.061 เมื่อนำไปสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์ เพื่อใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ตามแบบจำลอง square root model ของ McMeekin et al. (1987) ได้เป็น $\sqrt{r} = 0.061\sqrt{a_w - 0.902}(T - 272.4)$ จากนั้นนำไปทวนสอบความใช้ได้ของแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายกับค่าที่ได้จากการทดลอง พบว่ามีค่า RMSE เท่ากับ 0.02 ค่า Accuracy factor เท่ากับ 1.47 และค่า Bias factor เท่ากับ 0.93 ซึ่งทั้งสองค่าหลังมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าแบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้มีความเหมาะสม สามารถใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ที่อุณหภูมิระหว่าง 5 ถึง 25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ระหว่าง 0.947 ถึง 0.979

ภาควิชา.....สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา.....สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต

ปีการศึกษา 2553.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5075564431 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORDS :Mathematical model/ *Listeria monocytogenes*/ sodium chloride concentration/ temperature/ water activity/ Gompertz equation/ growth rate

SAOWALAK AKKHANIWAD : VALIDATION OF MATHEMATICAL MODEL FOR COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATION ON THE GROWTH RATE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN COOKED CHICKEN MEAT.THESIS ADVISOR: SUPHACHAI NUANUALSUWAN, Ph.D., 108 pp.

The objective of this study was to validate a mathematical model that predicted the growth of *Listeria monocytogenes* in cooked chicken meat. In this study, the growth response of *Listeria monocytogenes* in cooked chicken meat was affected by temperature (5-25 °C) and sodium chloride (NaCl) concentration (2-10% w/w). Growth curves were fitted using the modified Gompertz equation to evaluate specific growth rates (r). The combination of temperature and NaCl concentration has a significant effect on the growth rates of *Listeria monocytogenes* (p < 0.05). The growth relationship could be described by the Gompertz parameter, with the coefficients of determination (R square) of 0.885 - 0.967 and root mean square error (RMSE) of 0.02 - 0.04. The estimated minimum temperature (T_{min}) and minimum water activity (a_{wmin}) on the growth of *Listeria monocytogenes* were -0.7 °C (or 272.4 K) and 0.902, respectively. In addition the specific regression coefficient was 0.061. The mathematical model was generated in this study under different temperatures and NaCl concentrations according to the square root model (McMeekin. 1987) as following $\sqrt{r} = 0.061\sqrt{a_w - 0.902}(T - 272.4)$. The model was validated by RMSE (0.02), Bias factor (0.93) and Accuracy factor (1.47). So the results indicated that the mathematical model was suitable for predicting the growth rate of *Listeria monocytogenes* in cooked chicken meat for the temperature range between 5 and 25 °C and water activity range between 0.947 and 0.979.

Department : ... Veterinary Public Health ...

Student's Signature

Field of Study : ... Veterinary Public Health ...

Advisor's Signature

Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีทุกประการ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในด้านการศึกษา การทำวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนสำเร็จด้วยดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้อันมีค่าด้วยความเมตตาแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์ เกษม ตระกูลเลิศวิไล และนายสัตวแพทย์ ดร. วิษณุ วรรณแสง ผู้บังคับบัญชา สายงานวิชาการ วิเคราะห์ วิจัย ที่สนับสนุน และให้โอกาสสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาในหลาย ๆ เรื่อง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขที่อำนวยความสะดวกในเรื่องเอกสารต่าง ๆ ให้ดำเนินไปได้ด้วยดี และขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปริญญาโท -เอก ในภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่สาว และน้องชาย ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ของหน่วยงานวิชาการ-วิเคราะห์ วิจัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และดูแลให้มีกำลังใจ กำลังใจสนับสนุนในการศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 ความสำคัญ และความเป็นมาของ <i>Listeria monocytogenes</i>	7
2.2 โรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis)	10
2.3 การปนเปื้อนของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร.....	14
2.4 วิธีสำหรับการวัดการเจริญของจุลินทรีย์.....	20
2.5 การสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์..	23
แบบจำลองระดับปฐมภูมิ	24
แบบจำลองระดับทุติยภูมิ	25
แบบจำลองระดับตติยภูมิ	26
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญ ...	30
2.7 การประยุกต์ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การสำรวจหา <i>Listeria monocytogenes</i> จากเนื้อไก่ดิบ สำหรับใช้เป็นตัวแทน	
ในการทดสอบ	35
3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่อการเจริญของ	
<i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก	40
3.3 การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ ต่ออัตราการเจริญของ	
<i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก	41

3.4 การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และค่าสัมประสิทธิ์ ถดถอยของสมการที่ได้จากส่วนที่ 3	42
3.5 การสร้างแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตรา การเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก	42
3.6 การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก	43
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	
4.1 การสำรวจหา <i>Listeria monocytogenes</i> จากเนื้อไก่ดิบ	44
4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก.....	46
- ค่าปริมาณน้ำใช้ได้ ในเนื้อไก่ดิบ หลังเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์	46
- วิเคราะห์ความเหมาะสมข้อมูลการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i>	48
- อัตราการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก ของแต่ละคู่ปัจจัยการทดสอบ	53
4.3 การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญในรูป \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก	54
4.4 การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำใช้ได้ และค่าสัมประสิทธิ์ ถดถอยของสมการ $\sqrt{r} = b(T - T_{\min})$ ในรูป b^2	58
- สมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และ b^2	58
- แบบจำลองคณิตศาสตร์ผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์.....	59
4.5 การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการเจริญ และปริมาณน้ำใช้ได้ ความสัมพันธ์ระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$	60
4.6 ทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์	64
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	66

	หน้า
รายการอ้างอิง	72
ภาคผนวก	86
ภาคผนวก ก	87
ภาคผนวก ข	94
ภาคผนวก ค	105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	108



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางเคมีของ <i>Listeria monocytogenes</i> และ <i>Listeria spp.</i>	7
2	อัตราการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีปัจจัยกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์	8
3	สภาวะที่ <i>Listeria monocytogenes</i> เจริญและอยู่รอดได้	9
4	การระบาดของโรค Listeriosis ในผู้บริโภค	13
5	รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร	15
6	รายละเอียดของเขตจำกัดการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยกระทบต่างๆ	19
7	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ suspected colony ของ <i>Listeria monocytogenes</i>	45
8	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
9	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	49
10	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	50
11	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	51
12	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	อัตราการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยมีปัจจัย กระทบของอุณหภูมิ และเกลือ โซเดียมคลอไรด์	54
14	ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย (b) ของสมการความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก ของแต่ละความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์	57
15	ค่า RMSE ของสมการความสัมพันธ์ระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$ ของ <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก แต่ละอุณหภูมิ	63
16	ผลการทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุก ในแต่ละสภาวะ	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของ <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2	Typical growth curve ของจุลินทรีย์ เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ กับเวลา	21
3	แสดงความสัมพันธ์การพัฒนาระบบจำลองคณิตศาสตร์การทำนายการเจริญของจุลินทรีย์	24
4	แสดงวิธีการทดสอบ CAMP test ของ <i>Listeria monocytogenes</i>	39
5	ลักษณะ โคโลนีของ <i>Listeria monocytogenes</i> บนอาหาร oxford agar.....	44
6	ลักษณะ โคโลนีของ <i>Listeria monocytogenes</i> บนอาหาร ALOA agar.....	45
7	ลักษณะการแสดงผลการทดสอบ CAMP test ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ..	46
8	แสดงค่าปริมาณน้ำใช้ได้ ในเนื้อไก่ปรุงสุก หลังเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ร้อยละความเข้มข้นต่างๆ	47
9	อัตราการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุกของแต่ละคู่ปัจจัยของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์	53
10	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุกที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 2	55
11	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุกที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 4	55
12	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุกที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 6	56
13	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> ในเนื้อไก่ปรุงสุกที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 8	56
14	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และ b^2 ของสมการ $\sqrt{r} = b(T - T_{min})$	58
15	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	61
17	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	61
18	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	62
19	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ <i>Listeria monocytogenes</i> และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารที่มีแหล่งกำเนิดมาจากเนื้อไก่ กำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั่วโลก เนื่องจากเนื้อไก่ถือเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ ราคาถูก อีกทั้งยังมีปริมาณไขมันต่ำเมื่อเทียบกับเนื้อสัตว์ประเภทอื่น ปัจจุบันการผลิตอาหารจากเนื้อไก่จัดว่าเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ที่มีลักษณะการผลิตแบบครบวงจร กล่าวคือ เริ่มตั้งแต่ฟาร์มเลี้ยงไก่พ่อแม่พันธุ์ โรงฟักลูกไก่ ฟาร์มเลี้ยงไก่เนื้อ โรงงานผลิตอาหารสัตว์ กิจการขนส่ง โรงเชือด และโรงงานแปรรูป ซึ่งผู้ผลิตจะมีการนำระบบการจัดการที่เป็นมาตรฐานสากลมาใช้ควบคุมการผลิตในทุกขั้นตอนเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพ และมีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค ซึ่งความปลอดภัยของอาหารที่ผู้บริโภคในปัจจุบันให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก คือ ความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับแนวโน้มการเกิดปัญหาการเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอันเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรทั่วโลก

ผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง และ ผลิตภัณฑ์อาหารแช่เย็น มักพบการปนเปื้อนด้วย *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) สาเหตุที่ทำให้ *L.monocytogenes* ก่อปัญหาการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุก เกิดจากหลายปัจจัย เช่น การใช้เทคโนโลยี ในขั้นตอนการบรรจุผลิตภัณฑ์ โดยการจำกัดปริมาณก๊าซออกซิเจน เพื่อเพิ่มอายุของผลิตภัณฑ์ หรือ การควบคุมจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร (Parry, 1993) เป็นต้น ขณะเดียวกันเทคโนโลยีดังกล่าว อาจเป็นการส่งเสริมการเจริญเติบโต หรือ เพิ่มโอกาสการอยู่รอดของ *L.monocytogenes* เนื่องจาก *L.monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในสภาวะที่ต้องการก๊าซออกซิเจนปริมาณต่ำ (Buchanan and Klawitter, 1990) และสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิแช่เย็น (ช่วงอุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียส) รวมทั้งทนต่อสารกันบูดอาหารต่างๆ ได้ดี โดยปกติแล้วกระบวนการปรุงสุกเนื้อไก่ด้วยความร้อนในรูปแบบต่างๆ ทั้งการใช้ความร้อนแห้ง และความร้อนเปียก ในกระบวนการผลิตอาหาร สามารถกำจัด *L.monocytogenes* ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Jørgensen et al., 1995) ทั้งนี้การปรากฏของ *L.monocytogenes* ในอาหารพร้อมบริโภคนั้น อาจจะเนื่องมาจาก มี *L.monocytogenes* เหลือ

รอดปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ หรืออาจจะมีการปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารภายหลังกระบวนการปรุงสุก ซึ่งจะมีการเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตอาหาร ขึ้นอยู่กับวิธีการจัดการอาหารเหล่านั้น ในอาหาร RTE บางประเภท เช่น ไส้กรอกเยอรมัน หรือผลิตภัณฑ์อาหาร deli meats ต่างๆ ผู้บริโภคบางกลุ่มมักนิยมบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อนซ้ำ หากในอาหารเหล่านี้มีการปนเปื้อน *L.monocytogenes* ในระดับต่ำๆ แต่ยังคงถือว่าอาหารยังไม่ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากอาหารประเภทนี้จะเก็บในตู้เย็นเพื่อเพิ่มอายุอาหาร และระยะเวลาอาจมากพอที่จะทำให้ *L.monocytogenes* เจริญเพิ่มจำนวนจึงกระทั่งอยู่ในระดับทำให้เกิดการเจ็บป่วย (อ้างถึงโดย Gonzalez et al.,2007)

ที่ผ่านมา มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการหาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการปรุงสุกเนื้อไก่ด้วยความร้อน เพื่อกำจัด *L.monocytogenes* ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ โดยแนะนำอุณหภูมิ และเวลาสำหรับใช้ในกระบวนการปรุงสุกเนื้อไก่ด้วยความร้อนเปียก อยู่ในช่วง 55-70 องศาเซลเซียส ที่เวลา 38.94-0.07 นาที (Murphy et al.,2004) แต่ปัญหาการพบ *L.monocytogenes* ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร ณ จุดบริโภค ยังคงอยู่ ซึ่งทำให้มีการเรียกคืนสินค้าผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกจำนวนมาก โดยในปี 2007-2008 จากข้อมูลของ United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) รายงานว่ามีการเรียกคืนสินค้าที่มีสาเหตุมาจากการพบการปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ทั้งหมด 24 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 22 จากจำนวนที่เรียกคืนสินค้าทั้งหมด และเป็นสินค้าประเภทเนื้อไก่สูงถึงร้อยละ 50 โดย USDA-FSIS ซึ่งเป็นหน่วยงานของประเทศสหรัฐอเมริกาที่กำกับดูแลผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากเนื้อหมู เนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์ไข่โดยเฉพาะ กำหนดเป้าหมายอาหารปลอดภัยสำหรับ *L.monocytogenes* อยู่ที่ระดับ Zero tolerance ในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ในขณะที่คณะกรรมการอาหารยุโรป ซึ่งเป็นหน่วยงานรับผิดชอบออกกฎระเบียบที่ใช้ในกลุ่มประเทศสมาชิกสหภาพยุโรป ได้กำหนดให้ในผลิตภัณฑ์อาหารพร้อมบริโภคสำหรับทารก และผู้ป่วยในโรงพยาบาล ต้องปราศจาก *L.monocytogenes* ที่ระดับจุดบริโภค เช่นกัน แต่สำหรับอาหารพร้อมบริโภคประเภทอื่น อนุญาตให้พบจุลินทรีย์ดังกล่าวปนเปื้อนได้ไม่เกิน 100 เซลล์ต่อกรัม ณ จุดขายปลีกตลอดอายุของผลิตภัณฑ์

L.monocytogenes จึงเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีความสำคัญ ทั้งทางด้านสาธารณสุข และด้านอุตสาหกรรมผลิตอาหารจากเนื้อสัตว์เป็นอย่างยิ่ง ซึ่งการบริโภคอาหารที่อาจมีจุลินทรีย์ หรือพิษที่สร้างจากจุลินทรีย์ในปริมาณหนึ่งจะถือว่า มีความเสี่ยงในการเจ็บป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ ปัจจุบันการตรวจหาการปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ ด้วยวิธี conventional method เป็นวิธีการทดสอบแบบดั้งเดิมอ้างอิงตามมาตรฐานสากล แต่ในสถานการณ์ฉุกเฉินวิธีการนี้ถือว่าค่อนข้างมีศักยภาพต่ำ เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านเวลาที่ใช้ในกระบวนการทดสอบ และข้อจำกัดด้านจำนวนตัวอย่าง ทำให้ไม่สามารถตอบสนองสถานการณ์ได้อย่างทันที อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน และเพิ่มค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) ด้านความปลอดภัยของอาหารสำหรับผู้บริโภค ในห่วงโซ่อาหารระหว่างการส่งต่ออาหารจากโรงงานผู้ผลิตถึงผู้บริโภค (อ้างถึงโดย Wei and Fang, 2001) อีกทั้งมีข้อมูลบ่งชี้ว่าระยะเวลาที่จะสามารถตรวจพบ (time to detect) *L.monocytogenes* ในตัวอย่างมีผลต่อความปลอดภัยของอาหารด้วย หลังกระบวนการให้ความร้อนเซลล์ของ *L.monocytogenes* อาจจะมีอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ในทันที หรือมีจำนวนต่ำมาก ซึ่งการตรวจผลิตภัณฑ์สุดท้ายทันทีหลังผ่านกระบวนการความร้อนแล้วพบว่าปลอดภัยจากการปนเปื้อน ไม่สามารถมั่นใจได้ว่าอาหารนั้นปลอดภัยจริง โดยพบว่า time to detect ของ *L.monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และในไส้กรอกปั้นเหลว ที่ 4 องศาเซลเซียส เท่ากับ 217 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับเมื่อจำนวนเซลล์ตั้งต้นประมาณ 0.1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Gonzalez et al.,2007)

แม้ว่าผู้ประกอบการอาหาร จะมีความมุ่งมั่นต่อความปลอดภัย และคุณภาพของอาหารเป็นสำคัญ โดยพยายามนำเทคโนโลยีที่ทันสมัย มาใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้อาหารที่มีคุณภาพ และสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ รวมทั้งการปฏิบัติตามกฎระเบียบมาตรฐานอาหารอย่างเคร่งครัด แต่ยังไม่สามารถรับประกันความปลอดภัยของผู้บริโภคได้ทั้งหมด นอกจากนี้ผู้ประกอบการอาหารจะมีศักยภาพสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหาร และเก็บตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการได้ทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อุปสรรคด้านต้นทุน และแรงงานทำให้ไม่สามารถกระทำดังกล่าวได้ (Armitage, 1997) นอกเหนือไปกว่านั้นการควบคุมความปลอดภัยของอาหารด้านจุลินทรีย์ ผู้ประกอบการจะต้องควบคุมไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคมีโอกาสเจริญเพิ่มจำนวนตลอดทั้งห่วงโซ่อาหาร รวมถึงขั้นตอนการขนส่ง และการกระจายสินค้าด้วย แต่

ผู้ประกอบการคงไม่สามารถสัมผัสเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ณ จุดบริโภคได้ จากระเบียบการควบคุมความปลอดภัยของอาหารสำหรับบริโภคด้านจุลินทรีย์ของกลุ่มสหภาพยุโรป ตาม COMMISSION REGULATION (EC) NO.2073/2005 กำหนดว่า อาหารพร้อมบริโภคทุกประเภท ยกเว้นอาหารสำหรับเด็กทารก และอาหารสำหรับผู้ป่วยของโรงพยาบาล ที่จัดขายปลีก (products placed on the market) อนุญาตให้พบ *L.monocytogenes* ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 100 เซลล์ต่อกรัม ตลอดอายุของอาหาร (shelf-life) จึงจะเห็นว่ายังมีความเสี่ยงต่อการพบ *L.monocytogenes* ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายในระดับที่มีอันตรายต่อสุขภาพอยู่ หากมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งที่อาจไปสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการขนส่ง การเก็บรักษาเพื่อรอจำหน่าย หรือระหว่างที่อาหารอยู่ที่จุดจำหน่าย

ด้วยเหตุนี้แนวคิดของจุลชีววิทยาพยากรณ์ (Predictive microbiology) จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับประยุกต์ใช้ในงานด้านความปลอดภัยของอาหารที่เกี่ยวข้องกับตรวจสอบการปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่จุดบริโภค (point of consumption) โดยหากทราบถึงจำนวน *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ก่อนออกจากโรงงานผลิต และมีข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์ชนิดนี้อาศัยอยู่ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity; a_w) หรือ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็นต้น ตลอดเส้นทางกระจายสินค้า ไปยังจุดจำหน่าย ก็จะสามารถทำนายจำนวน *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ ณ จุดบริโภค และความเสี่ยงของผู้บริโภคได้ นอกจากนี้จุลชีววิทยาพยากรณ์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบกระบวนการปรุงสุกด้วยความร้อนที่สามารถกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ (thermal inactivity) อย่างมีประสิทธิภาพ (Farber and Peterkin, 2000) โดยการทำนายการอยู่รอดของจุลินทรีย์ก่อโรคหลังการให้ความร้อน เมื่อมีปัจจัยต่างๆของอาหารมากระทบ เช่น ค่าพีเอช ปริมาณน้ำใช้ได้ สารทนอมอาหาร หรือสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Fernandez et al.,2007; Shabala et al.,2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีของ *L.monocytogenes* เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ทนความร้อน (heat-resistant) และความแห้งได้ดี หรือประยุกต์ใช้ในการศึกษาการกำหนดอายุ (shelf lift) ผลิตภัณฑ์อาหารประเภท RTE ที่ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคภายใต้เงื่อนไขของ Regulation(EC) No 2073/2005 โดยใช้จุลชีววิทยาพยากรณ์มาประมาณการเจริญของ *L.monocytogenes* ในอาหาร

โดยความรับผิดชอบของ SANCO หรือประยุกต์ใช้ในงานการประเมินความเสี่ยงด้าน จุลินทรีย์ในอาหาร (Walls and Scott, 1997a)

จุลชีววิทยาพยากรณ์อาศัยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการอธิบายการตอบสนองของ จุลินทรีย์ต่อสิ่งแวดล้อมที่ทำให้จำนวนของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป และเป็นข้อมูลที่ได้มาจากการ ทดลองจริงโดยการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการอยู่รอดของจุลินทรีย์นั้นๆ เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ และทำนายความปลอดภัยของอาหารล่วงหน้า ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ สามารถนำเสนอในรูปแบบของสมการคณิตศาสตร์ หรือแบบจำลองคณิตศาสตร์ (Mathematical model) ที่ประกอบด้วยตัวแปรอิสระ (independent variable) และตัวแปรตาม (dependent variable) โดยที่ตัวแปรอิสระมักเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตหรือการอยู่รอดของจุลินทรีย์ ส่วนตัวแปรตามจะเป็นปริมาณ หรือความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในอาหาร ความก้าวหน้าของงาน ด้านจุลชีววิทยาพยากรณ์ในปัจจุบันจะเห็นว่ามีกรวิจัยอย่างแพร่หลายแต่ยังไม่ถูกนำไปใช้ใน งานของอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องมาจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะดำเนินการโดยใช้ข้อมูล การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจจะไม่มีความจำเพาะมากพอ หากนำไปใช้ทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารจริง เพราะองค์ประกอบของอาหารสำหรับ มนุษย์บริโภคจะมีความซับซ้อนมากกว่าโดยเฉพะอาหารที่ผลิตจากเนื้อสัตว์ (McMeekin et al., 1987)

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ และเกลือ โซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ใน ผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุก และสร้างแบบจำลอง คณิตศาสตร์ที่จำเพาะเพื่อใช้ สำหรับ ในการทำนาย อัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ที่แยกได้ในโรงงาน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาผลของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก
- 2) ดำเนินการทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับ การทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยอาศัยปัจจัยอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการศึกษาจะได้แบบจำลองคณิตศาสตร์ ที่มาจากผลกระทบของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความจำเพาะต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก สายพันธุ์ที่พบในโรงงาน สามารถใช้ทำนายจำนวน *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ ซึ่งคาดว่าประโยชน์ที่ได้รับ คือ

- 1) สามารถใช้ประเมินอันตราย หรือโอกาสการเจ็บป่วยของผู้บริโภค ที่มีสาเหตุมาจากการพบการปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุก เพิ่มจากวิธี conventional เพื่อประกอบการตัดสินใจ ช่วย ลดเวลา และต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
- 2) สามารถประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกที่ออกจากโรงงานผลิต ณ จุดการบริโภค และสามารถลดความไม่แน่นอนด้านความปลอดภัยของอาหารในห่วงโซ่อาหารได้
- 3) แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้จากการศึกษาสามารถเป็นต้นแบบ (prototype) สำหรับใช้ศึกษากับจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม foodborne pathogen ชนิดอื่น หรือในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น

นอกจากนี้งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางการศึกษาแบบจำลองคณิตศาสตร์เพื่อการทำนายจำนวนจุลินทรีย์สำหรับงานด้านอื่น อาทิ แบบจำลองสำหรับการทวนสอบกระบวนการฆ่าจุลินทรีย์ด้วยความร้อน หรือประยุกต์ใช้ในการประเมินความปลอดภัยของอาหาร กรณีมีการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นต้น

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญ และความเป็นมาของ *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*L.monocytogenes*) เป็นที่รู้จักว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์มากกว่า 70 ปี (Murray et al.,1996) แต่ยังไม่ได้รับความสำคัญมากนักในด้านของทางอุตสาหกรรมอาหาร จนเมื่อระยะ 20-30 ปีที่ผ่านมา ที่พบว่ามี การถ่ายทอดผ่านทางอาหาร และทำให้เกิดโรคในมนุษย์ โดยเป็นสาเหตุของโรค Febrile gastroenteritis

L.monocytogenes จัดอยู่สกุล *Listeria* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาดประมาณ 0.45-0.5 x 0.5-2.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส โดยใช้แฟลกเจลลา ชนิด peritrichous เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญเพิ่มจำนวน ทั้งในสภาวะที่ใช้อากาศ และใช้อากาศเพียงเล็กน้อย (facultatively anaerobic) ประกอบด้วย 13 ซีโรไทป์ คือ 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c 4d, 4e และ 7 โดยบ่งชี้ความแตกต่างจากชนิดของ O factor และ H factor (Seeliger and Hohes,1979) โดยทุกซีโรไทป์มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค Listeriosis แต่ซีโรไทป์ที่พบบ่อย คือ 1/2a, 1/2b หรือ 4b

ตารางที่ 1: คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *L.monocytogenes* และ *Listeria spp.* (ICMSF,1996)

species	β -haemolysis	การสร้างกรดจากน้ำตาล		
		L-Rhamnose	D-Xylose	D-Mannitol
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	-	-
<i>L.innocua</i>	-	+/-	-	-
<i>L.ivanovii</i>	++	-	+	-
<i>L.welshimeri</i>	-	+/-	+	-
<i>L.seeligeri</i>	+ _{weak}	-	+	-
<i>L,grayi</i>	-	-	-	+

จากที่ *L.monocytogenes* เป็น แบคทีเรีย ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (ubiquitous bacterium) เช่น สิ่งปฏิกูล ดิน ซากพืชที่เน่าเปื่อย มูลสัตว์ทั้งสัตว์ป่า และสัตว์เลี้ยง หรือแม้กระทั่ง ในมูลสัตว์ของนก หรือสัตว์ปีก ดังนั้นจึงทำให้สามารถพบได้ในอาหารดิบ (raw food) หลายชนิด *L.monocytogenes* สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้ 3 ทาง คือ สัมผัสกับสัตว์ โดยตรง รับเชื้อข้ามจาก ทารกแรกเกิดในโรงพยาบาล และผ่านทางอาหาร โดย *L.monocytogenes* อาจพบในลำไส้ของคน สุขภาพปกติได้แบบชั่วคราว โดยจากการศึกษาของ Muller (1990) พบว่าสามารถแยกพบ *L.monocytogenes* จากอุจจาระของคนงานสุขภาพ ปกติในไลน์ผลิตอาหารจำนวน 2,000 คน ที่ อัตราร้อยละ 0.8 แม้จะสามารถรับจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้หลายทาง แต่ ที่สัมพันธ์กับการ ทำให้เกิดโรค listeriosis ในมนุษย์เป็นส่วนใหญ่ ก็คือการรับ *L.monocytogenes* จากการปนเปื้อนมากับอาหาร ที่บริโภคประจำวัน

L.monocytogenes จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม psychrotropic ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส แต่จะสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาอาหาร ทั่วไป จะอยู่ในช่วง 0-8 องศาเซลเซียส แม้จะมีการเจริญได้ในอัตราที่ต่ำในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว แต่ใน อาหารที่ไม่มีคุณลักษณะที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L.monocytogenes* เช่น ค่ำพีเอช จะทำให้ อายุการเก็บอาหาร (shelf life) สั้นลง หรือบางครั้งอายุ ของอาหารอาจมากพอที่จะทำให้ *L.monocytogenes* เพิ่มจำนวนจนกระทั่งอยู่ในระดับที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้

ตารางที่ 2: แสดงอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ใน สภาวะที่ไม่มีปัจจัยกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Mossel et al.,1995)

Lag time (ระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ปรับสภาพเซลล์ในสิ่งแวดล้อมที่อาศัยก่อนการแบ่งเซลล์)					
อุณหภูมิ (°C)	0-1	2-3	5-6	7-8	9-10
เวลา (วัน)	3-33	2-8	1-3	2	<1.5
Generation time (เวลาที่จุลินทรีย์ใช้สำหรับแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า)					
อุณหภูมิ (°C)	0-1	4-5	10-13		
เวลา (ชั่วโมง)	62-131	13-25	5-9		

โดยปกติ *L.monocytogenes* จะมีความสามารถเจริญได้ในอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของอาหาร เช่น ค่าพีเอช ปริมาณน้ำใช้ได้ หรือสารประกอบของอาหาร และสภาวะที่อาหารชนิดนั้นๆ ถูกเก็บรักษา อย่างไรก็ตามถึงแม้ *L.monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในอาหารที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิต่ำกว่าสภาวะที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวน แต่ยังคงพบว่ามีจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าวสามารถอยู่รอดได้ (survive) ในอาหารเป็นเวลานาน โดย International Commission on Microbiological Specifications for Food รายงานในปี 1996 ว่า *L.monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมูปด ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดได้มากกว่า 6 เดือน หรือในเนื้อดิบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดได้มากกว่า 14 วัน ขณะที่ Lund (2000) รายงานว่า *L.monocytogenes* อยู่รอดได้ใน ice cream และ Ewes' milk ที่ -18 องศาเซลเซียส มากกว่า 5 เดือน และ 7 เดือน ตามลำดับ

ตารางที่ 3 : สภาวะที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญ และอยู่รอดได้ (ICMSF,1996)

ปัจจัย	ช่วงต่ำสุด	ช่วงที่เหมาะสม	ช่วงสูงสุด
อุณหภูมิ (°C)	-0.4	37	45
ความเป็นกรดต่าง	4.4	7.0	9.4
ความทนเกลือ (%)	N/A*	10	25% ที่ 4 °C
ออกซิเจน (%)	N/A	5	N/A
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.90	0.92	0.97

* N/A : Not applicable

2.2 โรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis)

โรค Listeriosis มีรายงานครั้งแรกในปี 1953 หลังจากเกิดกรณีทารกคลอดก่อนกำหนดที่สัมพันธ์กับมารดาที่บริโภคน้ำนมดิบจากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (mastitis) และเป็นที่ยอมรับมากขึ้นเมื่อเกิดระบาดครั้งรุนแรง ในช่วงทศวรรษที่ 1980 ในอเมริกาเหนือ และยุโรป ซึ่งมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อน *L.monocytogenes* ในอาหาร โรค Listeriosis แบ่งตามลักษณะทางคลินิกได้เป็น 2 ประเภท คือ invasive listeriosis และ non-invasive listeriosis โดย invasive listeriosis จะเกิดการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อลำไส้ แล้วสามารถรุกรานไปยังส่วนอื่นๆ ซึ่งผู้ป่วยจะมีโอกาสเสียชีวิตสูง ส่วนประเภท non-invasive listeriosis ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการท้องร่วง มีไข้ ปวดศีรษะ และปวดกล้ามเนื้อ (Aureli et al.,2000)

ผู้ป่วยจะได้รับ *L.monocytogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สาเหตุของโรค จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน *L.monocytogenes* เป็นทางหลัก โดยอุบัติการณ์การเกิดโรค Listeriosis ในกลุ่มประชากรอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น อาทิ โรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) หรือแคมไพโลแบคทีเรียโอซิส (campylobacteriosis) แต่อย่างไรก็ตามโรสดังกล่าวจะมีอัตราการตายของผู้ป่วยสูง โดยเฉพาะหากเกิดกับกลุ่มประชากรจำเพาะ คือ หญิงมีครรภ์ ทารกแรกเกิด ผู้สูงอายุ หรือผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือไม่สมบูรณ์ ลักษณะกลุ่มอาการของโรค Listeriosis คือ การติดเชื้อใน กระแสเลือด การเกิด เยื่อสมองอักเสบ หรือ เยื่อสมองร่วมกับไขสันหลังอักเสบ (meningoencephalitis) (McLauchlin,1993) ในผู้หญิงตั้งครรภ์หากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะทำให้เกิดภาวะแท้ง หรือคลอดก่อนกำหนด หรือทารกมีความผิดปกติ เนื่องจากติดเชื้อที่ตัวอ่อน ทารกแรกเกิดที่ติดเชื้อ *L.monocytogenes* จะมีอัตราการเสียชีวิตสูงประมาณร้อยละ 35 ส่วนโรค Listeriosis แบบ milder form จะทำให้เกิดอักเสบของลำไส้ และกระเพาะอาหาร (Salamina et al.,1996)

กลไกการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจาก *L.monocytogenes* มีความซับซ้อนขึ้นอยู่กับการปัจจัย เช่น ระดับภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน จำนวนของเซลล์ที่รับเข้าสู่ร่างกาย และความรุนแรงของสายพันธุ์ของ *L.monocytogenes* แต่เชื่อว่า Listeriolysin O คือปัจจัยหลักที่บ่งชี้ความรุนแรงของ *L.monocytogenes* (Kathariou, 2002)

กระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ และการแพร่กระจายขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันของผู้รับเชื้อ (T cell mediated immunity) หลังจากการรับ *L.monocytogenes* เข้าสู่ร่างกายโดยปนเปื้อนมา กับอาหารที่บริโภค แล้วไปก่อตัวอยู่ที่เยื่อเมือกในลำไส้ ซึ่งแต่ละขั้นตอนในกระบวนการจะต้องอาศัย virulence factor ที่จำเพาะ (Domann et al., 1992; Marquis et al., 1995; Gaillot et al., 2000; Dramsi et al., 1997, 2004) ดังนี้

- 1) internalin ควบคุมด้วยยีน *inl* ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการรุกราน (invasion) epithelial cells ของ *L.monocytogenes* โดยโปรตีน internalin จะมีความจำเพาะกับ receptor บนผิวเซลล์ของ macrophages จะเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกิน (phagocytosis) ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell)
- 2) listeriolysin O ควบคุมด้วยยีน *hlyA* และ phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) ควบคุมด้วยยีน *plcA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการทำให้เกิดการแตก (lysis) ของ phagosome ก่อนเกิด phagolysosome fusion เพื่อให้ *L.monocytogenes* รอดจากการถูกทำลาย และออกมาเพิ่มจำนวนใน cytoplasm
- 3) act A-protein ควบคุมด้วยยีน *actA* เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเคลื่อนที่ไปยังเซลล์อื่น (direct cell-to-cell) โดยส่งเสริมการสร้าง actin ซึ่งทำให้ *L.monocytogenes* สามารถรุกรานไปยังเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ (intracellular) อื่นๆ ได้
- 4) เอนไซม์ต่างๆ เช่น lecithinase, zinc metal protease และ serine protease
- 5) Fibronectin-binding protein (FbpA) จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อตัว (colonization) ที่ลำไส้ และตับ ซึ่งตับจะเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักในการรุกราน ขณะที่ *L.monocytogenes* มีการแบ่งตัวที่ตับ หรือม้าม มีอาการหนาวสั่น และมีไข้



รูปที่ 1 : กระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของ *L. monocytogenes*.. : (1) *L. monocytogenes* บุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (2) ออกจาก phagosome โดยการทำงานของ listeriolysin O และ phospholipase C แล้วเพิ่มจำนวนภายใน cytoplasm (3) แพร่กระจายไปยังเซลล์อื่นๆ โดยใช้ actin filaments.

จากเหตุผลที่ว่า การแพร่กระจายของ *L. monocytogenes* ในร่างกายจะขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับ *L. monocytogenes* เป็นสำคัญ ดังนั้นโรคนี้จึงส่งผลกระทบต่อประชากรบางกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อโรคมากกว่าประชากรทั่วไป เช่น เด็กทารก คนสูงอายุ และหญิงมีครรภ์ โดย Armstrong (1995) รายงานว่า จากเอกสารทางการแพทย์มีผู้ป่วยด้วยโรค Listeriosis เป็นหญิงตั้งครรภ์ ประมาณร้อยละ 33 รวมถึงผู้ป่วยหรือผู้ที่มีความบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน ก็มีความเสี่ยงต่อโรค Listeriosis สูงเช่นกัน Farber และ Peterkin (2000) พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรค listeriosis จำนวน 200 คน เป็นผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะเป็นโรคมะเร็งร้อยละ 61 ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะร้อยละ 15 ผู้ป่วยโรคเบาหวานร้อยละ 24 ผู้ป่วยตับอักเสบ และผู้ป่วยโรค AIDS ร้อยละ 5 เป็นต้น จะเห็นว่าทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่มีภาวะของระบบภูมิคุ้มกันไม่สมบูรณ์ทั้งสิ้น

ตารางที่ 4: ตัวอย่างการระบาดของโรค Listeriosis ในผู้บริโภครวม (McLauchlin et al.,2004)

ประเทศ	ปี	อาหาร	จำนวนผู้ป่วย	จำนวนคนตาย	ซีโรไทป์
USA	1976	Raw salad	20	5	4b
New Zealand	1980	Fish	22	7	1/2a
Canada	1981	Coleslaw	41	18	4b
USA	1983	Milk	49	14	4b
USA	1985	Soft cheese	142	30	4b
Switzerland	1983-1987	Soft cheese	122	34	4b
UK	1987-1989	Pate	355	94	4b
France	1993	Pork tongue in aspic	279	-	4b
France	1993	Pork rillettes	38	10	4b
USA	1994	Milk	45	0	1/2b
Sweden	1994-1995	Fish	9	2	4b
France	1995	Soft cheese	17	4	4b
Canada	1996	Crab meat	2	0	1/2a
Italy	1997	Salad	1566	0	4b
USA	1998-1999	Hot dog	50	>8	4b
Finland	1998-1999	Butter	25	6	3a
Finland	1999	Fish	5	-	1/2a
France	1999-2000	Pork rillettes	10	2	4b
France	1999-2000	Pork tongue in jelly	32	10	4b
USA	2000	Turkey meat	29	7	-
Switzerland	2005	Soft cheese	3	1	-

จากข้อมูลตัวอย่างการระบาดในช่วงปี 1976 ถึง 2005 จะเห็นได้ว่า *L.monocytogenes* ที่พบจะเป็นซีโรไทป์ 4b เป็นส่วนใหญ่ โดยมีอัตราการเจ็บป่วย และอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูง (McLauchlin et al.,2004) อีกทั้งขนาดการก่อให้เกิดการเจ็บป่วย (infectious dose) ของ *L.monocytogenes* จะอยู่ในระดับต่ำ ในผู้ป่วยบางรายมีรายงานว่าได้รับ *L.monocytogenes* เพียงแค่ 100 เซลล์เท่านั้น

2.3 การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

จากที่ *L.monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม จึงมักพบการปนเปื้อนในเน้มนม นมพาสเจอร์ไรส์ และ soft cheese รวมถึงพบมีการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ดิบทั้งประเภทเนื้อไก่ และเนื้อวัว เนื่องจากธรรมชาติของเนื้อสัตว์ดิบจะมีระดับปริมาณน้ำใช้ได้สูง (มากกว่า 0.98) มีค่าพีเอชอยู่ในระดับกลาง (5.5-6.5) และเป็นแหล่งพลังงาน คาร์บอน และสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Varnam and Sutherland,1985) ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร จากเนื้อสัตว์ ถือว่า *L.monocytogenes* เป็นปัญหาหลักของกระบวนการผลิต โดยจะเห็นว่ามีความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อน ในอาหารได้ในทุกขั้นตอนของการผลิต เนื่องจาก *L.monocytogenes* สามารถก่อตัว และอยู่รอดได้บนพื้นผิวของอุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ หรือบริเวณผนังเป็นระยะเวลาสั้น สามารถ ทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อต่างๆ อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ชนิดนี้คุณสมบัติที่สามารถสร้าง biofilm ได้ (Chasseingnaux et al.,2002, Giovannacci et al.,2000, Herald and Zottola,1998) นอกจากนี้ *L.monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานการปนเปื้อนในอาหารประเภทพร้อมบริโภค (ready-to-eat ; RTE) ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเพื่อขยายอายุการเก็บของอาหาร ซึ่งเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการทำให้ความร้อนในกระบวนการผลิต (Roberts et al.,1996 และ Bell and Kyriakides,2002) โดยเชื่อว่าเป็นการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิต (post contamination) การที่ *L.monocytogenes* มีคุณสมบัติสามารถดำรงชีวิต และเจริญได้ที่อุณหภูมิในตู้เย็น ช่วงอุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อสารนอมอาหารต่างๆ ได้เป็นอย่างดี (อ้างถึงโดย Gandhi and Chikindas, 2007) นอกจากนี้จะเป็นปัจจัยหลักที่ต้องมีการควบคุมแล้ว มีอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องให้ความสนใจคือ ผู้บริโภคบางรายจะมีพฤติกรรมการบริโภคอาหารประเภท RTE โดยไม่ผ่านความร้อนซ้ำ (reheat) โดยเฉพาะอาหารกลุ่มไส้กรอก และผลิตภัณฑ์ปรุงสุกจากเนื้อสัตว์ (deli meat) ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารในกลุ่มนี้จะมีความเสี่ยงเพิ่มมากขึ้นถ้ามีการปนเปื้อนจาก *L.monocytogenes* ที่จำนวนเริ่มต้นในระดับที่ต่ำมากๆ ซึ่งอาจทำให้ตรวจไม่พบทันทีหลังผ่านกระบวนการผลิตจากโรงงาน จะเห็นได้จากรายงานการตรวจพบ *L.monocytogenes* ร้อยละ 0.89 ถึง 3.5 ในอาหารผลิตภัณฑ์ปรุงสุกจากเนื้อสัตว์ (Gombas et al.,2003)

Busani และคณะ (2005) ได้สำรวจอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* เกินมาตรฐานอาหารในอาหารที่ผลิตมาจากสัตว์ โดยประเทศอิตาลีกำหนดมาตรฐานอาหารไว้คือ ห้ามพบ *L.monocytogenes* ในอาหาร 25 กรัม สำหรับอาหารประเภท RTE ส่วนในอาหารที่ต้องปรุงสุกก่อนบริโภค ให้พบ *L.monocytogenes* ได้ไม่เกิน 110 โคโลนีต่อกรัม ระหว่างปี 2001-2002 พบว่าจากจำนวนตัวอย่างอาหาร 42,300 ตัวอย่าง ตรวจพบ *L.monocytogenes* คิดเป็นร้อยละ 2.4 โดยเป็นอาหารที่ผลิตมาจากเนื้อหมู ร้อยละ 10.3 เนื้อวัว ร้อยละ 64 เนื้อไก่ ร้อยละ 1.9 และจากปลา ร้อยละ 6.5 นอกจากนี้ยังมีรายงานอุบัติการณ์ในอาหารจากแหล่งอื่นๆ ตามรายละเอียดในตารางที่ 5 (Bell and Kyriakides, 2005)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
USA		
Raw cows' milk from farm bulk tanks	12/292 (4.1)	Rohrbach et al. (1992)
UK		
Raw cows' milk from farm bulk tanks	102/2009 (5.1)	O'Donnell (1995)
UK		
Raw cows' drinking milk	32/1591 (2)	Anon. (1998a)
Spain		
Raw caprine milk	37/1445 (2.56)	Gaya et al. (1996)
Sweden		
Soft and semi soft cheeses	20/333 (6)	Loncarevic et al. (1995)
UK		
Ready to eat foods:		
Raw salad vegetable ,pre-packed	77/2123 (3.6)	Little et al. (1997a)
Crudités, pre-packed	2/242 (0.8)	
Spain		
Ready to use mixed vegetable salads	21/70 (30)	Garcia-Gimeno et al (1996)
USA		
Vegetable salads	1/63 (1.6)	Lin et al. (1996)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร (ต่อ)

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
Malaysia		
Raw chicken portions	19/32 (59)	Arumugaswamy et al (1994)
Raw beef	6/12 (50)	
Fresh prawns-raw	7/16 (44)	
Leafy vegetable	5/22 (23)	
Ready to eat squid, prawns, chicken and clams	6/27 (22)	
Italy		
Fresh ground beef, fresh pork and sausages	65/490 (13.3)	Comi et al (1992)
Denmark		
Raw fish	33/232 (14.2)	Norrung et al. (1999)
Raw meat	106/343 (30.9)	
Brazil		
Dressed lamb carcasses	3/69 (4.3)	Antoniollo et al. (2003)
USA		
Raw meats:		Amoril and bhunia (1999)
Ground beef and steak	6/20 (30)	
Poultry-regular-cut chicken and skinless-boneless chicken	7/20 (35)	
Ground pork	171/340 (50.2)	
Northern Ireland		
Raw chicken (retail)	14/80 (17.5)	Kanuganti et al. (2002)
France		
Breton live shellfish	11/120 (9.2)	Monfort et al. (1998)
UK		
Cooked, ready to eat, out of shell molluscs	221/2425 (9.1)	Little et al. (1997b)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร (ต่อ)

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
USA		
Ready to eat meat and poultry products (USDA-FSIS testing program 1999)		Anon. (2000a)
Large sausage	(0.4)	
Small sausage	(1.8)	
Cooked poultry	(1.4)	
Salads/spreads	(1.1)	
Sliced ham/pork	(4.6)	
Fermented sausage	(2.1)	
Argentina		
Seafood (hake, mackerel, squid, mussel)	3/100 (3)	Laciar and de Centorbi (2002)
USA		
Crawfish (raw, whole)	3/78 (3.8)	Thimothe et al. (2002)
UK		
Ready to eat meat:		Elson et al. (2004)
Sliced meats	61/2894 (2.1)	
Pate	22/1184 (1.86)	
USA		
Ready to eat foods:		Gombas et al. (2003)
Bagged salads	22/2966 (0.74)	
Smoked seafood and seafood salads	229/5090 (4.5)	
Deli salads	202/8549 (2.36)	
Cheeses	42/5901 (0.71)	
Luncheon meat	82/9199 (0.89)	
Denmark		
Samples examined at the end of commercial shelf life:		Jorgensen and Huss (1998)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร (ต่อ)

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
Cold smoked salmon	(40)	Jorgensen and Huss (1998)
Cold smoked halibut	(60)	
Gravad salmon and halibut	(25)	
Heat-treated seafood	(12)	
Spain		
Prepared salads	15/146 (10.3)	De Simon and Ferrer (1998)
Prepared meals:		
Vegetables	8/217 (3.7)	
Meat, Poultry	16/324 (4.9)	
Seafoods	2/137 (1.4)	
Denmark		
Preserved fish products not heat-treated	35/335 (10.4)	Norrung et al. (1999)
Preserved meat product not heat-treated	77/328 (23.5)	
	45/772 (5.8)	
Heat-treated meat product	670/7703 (8.7)	
Prepared retail foods including meat, fish, vegetable and cheese product (LM>10/g.)		
Korea		
Frozen, smoked mussels –imported	3/68 (4.4)	Baek et al. (2000)
Ice cream-imported	8/132 (6.1)	
Domestic foods	111/1337 (8.3)	
Finland		
Fish roe (rainbow trout, white fish, vendace, burbot), fresh, frozen or frozen-thawed	7/147 (4.8)	Miettinen et al. (2003)

จากข้อมูลการสำรวจอุบัติการณ์ของ *L.monocytogenes* ในอาหารจากตารางที่ 5 จะเห็นว่าสามารถตรวจพบ *L.monocytogenes* ได้ในอาหารหลากหลายชนิด และส่วนใหญ่จะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีต้นกำเนิดมาจากสัตว์ ซึ่งเนื้อสัตว์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโอกาสเน่าเสียง่าย ยกเว้นมีการจัดการที่ถูกต้องสำหรับการเก็บรักษา การผลิต การบรรจุ และการขนส่ง ซึ่งการเน่าเสียจะมีสาเหตุมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ และนำมาถึงอันตรายที่อาจเกิดกับผู้บริโภค โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารโดยไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติกับสภาพอาหารปกติ หรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์มีผลเกิดจากสภาพของสัตว์ก่อนถูกฆ่า วิธีการฆ่า และการจัดการภายในโรงฆ่าเกี่ยวกับการรักษาซาก (Jackson et al.,1997) ขณะที่การเกิด การปนเปื้อน *L.monocytogenes* ภายหลังกระบวนการทำสุกแล้ว ความเสี่ยงนี้จะลดลงถ้ามีกระบวนการล้างและฆ่าเชื้อที่บริเวณ food contact surface อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งการควบคุมให้มีกระบวนการผลิตอาหารอย่างถูกสุขลักษณะ ตามหลัก good sanitary practices

แม้ว่า *L.monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ -0.4 จนถึง 45 องศาเซลเซียส แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเจริญ โดย ICMSF (1996) รายงานถึงขอบเขตการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่มีปัจจัยกระทบเป็นอุณหภูมิ ค่า พีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ ดังนี้

ตารางที่ 6 : สภาวะจำกัดการเจริญของ *L.monocytogenes* (ICMFS, 1996)

	ต่ำสุด	เหมาะสม	สูงสุด
อุณหภูมิ (°C)	-0.4	37	45
pH	4.39	7.0	9.4
NaCl	-	-	10%
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.90 (glycerol,30°C)	-	-
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.92 (NaCl)	-	-
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.93 (sucrose)	-	-

แต่การเจริญของ *L.monocytogenes* ในอาหารจริงๆ จะมีความจำเพาะมากกว่าข้อมูลในตาราง ที่ 6 เนื่องจากในอาหารจะมี interactions ของปัจจัยเหล่านี้ Farber และ Hartwig (1996) สรุปว่า สภาวะที่ *L.monocytogenes* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร ready to eat (RTE) มี 3 สภาวะ คือ อาหารมีสภาวะ ของค่า พีเอช อยู่ในช่วง 5.9-5.5 และปริมาณน้ำใช้ได้ น้อยกว่า 0.95 หรือ พีเอช น้อยกว่า 5.0 โดยไม่ต้องคำนึงถึงค่าปริมาณน้ำใช้ได้ของอาหาร หรือ ค่าปริมาณน้ำได้ในอาหาร น้อยกว่า 0.92 โดยไม่ต้องคำนึงถึงค่าพีเอช นอกจากนี้ลักษณะตามธรรมชาติของอาหารชนิดนั้นๆ ก็มีผลต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* ต่างกัน โดยพบว่าเนื้อไก่จะมีคุณสมบัติส่งเสริมให้ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ดีกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น (Glass and Doyle, 1989) รวมถึง พื้นฐานด้านจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) (Farber and Peterkin, 1991)

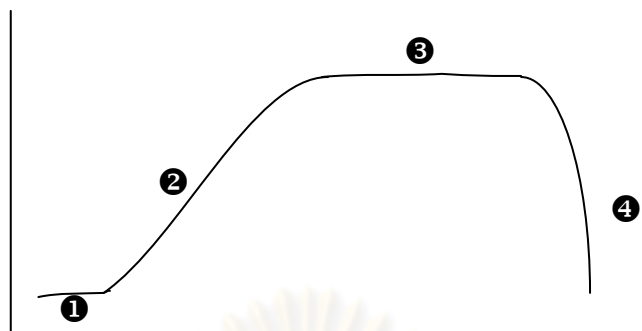
2.4 วิธีสำหรับการวัดการเจริญของจุลินทรีย์

การเจริญ (growth) ในทางจุลชีววิทยา หมายถึง การที่จำนวนของจุลินทรีย์ ซึ่งถือว่าเป็น การเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณ มากกว่าการเพิ่มขนาดของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นผลมา จากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และฟิสิกส์ภายในเซลล์ การเจริญเติบโตของประชากรนั้นสามารถที่ จะตรวจสอบได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ หรือมวลชีวภาพ (biomass) ของ ประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งเรียกว่า "อัตราการเจริญ" (growth rate) เวลาที่ใช้ในการเพิ่ม จำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า เรียกว่า generation time หรือ doubling time โดยขึ้นอยู่กับ ชนิดของจุลินทรีย์ และนสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่

การเจริญของจุลินทรีย์สามารถศึกษาได้จาก เส้นโค้ง การเจริญ (growth curve) โดยที่ typical growth curve แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ตามรูปที่ 2) คือ

1. lag phase เซลล์จะอยู่ในช่วงการปรับตัวก่อนแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน
2. log phase เซลล์มีการเจริญอย่างเต็มที่ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (exponential)
3. stationary phase อัตราการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 0 หรืออัตราการเพิ่มเท่ากับอัตราการตาย
4. decline หรือ death phase อัตราการเพิ่มจำนวนน้อยกว่าอัตราการตาย

จำนวนจุลินทรีย์ (logCFU)



เวลา

รูปที่ 2: typical growth curve ของจุลินทรีย์ เปรียบเทียบระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ กับเวลา

การทวีจำนวนโดยวิธี binary fission ของแบคทีเรียจะทำให้จำนวนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นแบบ
อนุกรมเรขาคณิต วิธีการวัดการเจริญของแบคทีเรียมีหลายวิธีด้วยกัน คือ

1. Counting chamber method เป็นการนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้สไลด์
ที่เรียกว่า Petroff Hausser ที่ทำเป็นร่อง ซึ่งทราบขนาดของความกว้างและความลึก เมื่อ
หยด suspension ของแบคทีเรียแล้วปิดด้วย cover slide นำไปตรวจดูด้วยกล้อง
จุลทรรศน์แบบ compound microscope หรือแบบ phase microscope นับจำนวน
แบคทีเรียที่พบแล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรใน suspension ได้ข้อดีของ
วิธีนี้คือ สามารถทราบจำนวนแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว และสามารถสังเกตลักษณะของ
แบคทีเรียที่นับได้ด้วย ข้อเสียคือ เป็นการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งไม่สามารถแยกได้
ว่าแบคทีเรานั้นมีชีวิตหรือไม่ และไม่เหมาะที่จะนับจำนวนแบคทีเรียใน suspension ที่มี
ปริมาณมากหรือน้อยเกินไป
2. plate count technique เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ มี 2
วิธี คือ วิธีแรกเรียก pour plate โดยการนำ suspension ของแบคทีเรียจำนวนหนึ่งใส่จาก
เพาะเชื้อแล้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวลงไป เขย่าให้เชื้อแพร่กระจาย ทิ้งไว้ให้แข็ง
นำไปป่มเชื้อ ส่วนวิธีที่สองเรียกว่า spread plate โดยนำจานเพาะเชื้อที่อาหารแข็งไว้จน
แข็ง หยด suspension ของแบคทีเรียลงไป แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยให้เชื้อ
แพร่กระจาย นำไปป่มเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสม ประมาณ 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ได้

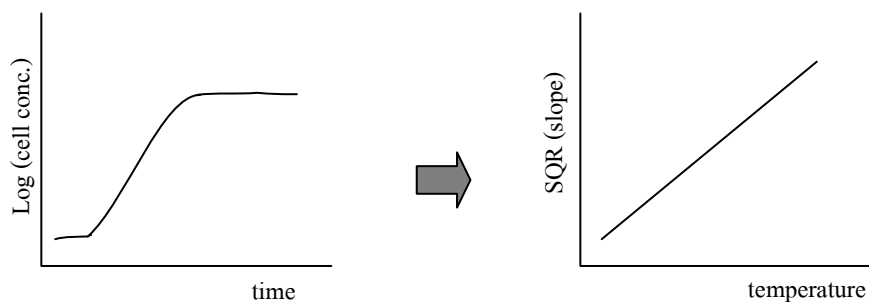
โดยถือว่าแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเซลล์ได้มาจากการประมาณ 30-300 โคโลนี เท่านั้น ถ้ามีมากกว่านี้ต้องนำ suspension มาทำให้เจือจางเสียก่อน ข้อดีของวิธีนี้เป็นการทำงานแบบที่เรียกที่ถูกต้อง เพราะนับเฉพาะแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้น นอกจากนี้ยังทำได้ง่าย รวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือ แต่ละกลุ่มเซลล์ของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น บางครั้งอาจไม่ได้เกิดจากเซลล์เดียว แต่เกิดจากหลายๆเซลล์ที่อยู่ใกล้กัน มีการเจริญและทวีจำนวนจนเกิดเป็นกลุ่มเซลล์เดียวกันได้ ดังนั้นจำนวนแบคทีเรียที่ได้จึงน้อยกว่าจำนวนที่เป็นจริง

3. การวัดความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียใน suspension โดยใช้เครื่องวัดที่เรียกว่า spectrophotometer ซึ่งใช้หลักการฉายแสงผ่าน suspension ของแบคทีเรีย แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียดูดซับไว้ ซึ่งปริมาณแสงที่ถูกดูดซับจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับขนาดของเซลล์หรือจำนวนแบคทีเรีย กล่าวคือ เซลล์แบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่จะดูดซับแสงไว้ได้มากกว่าเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า หรือ suspension ที่มีแบคทีเรียจำนวนมากจะดูดซับแสงไว้ได้มากกว่า suspension ที่มีจำนวนเซลล์น้อยกว่า การวัดปริมาณการเจริญของแบคทีเรียวิธีนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นการวัดความขุ่นของ suspension นั้นเอง ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้สะดวก รวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือเป็นการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าแบคทีเรียนั้นมีชีวิตหรือไม่
4. วัดหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ วิธีนี้เป็นการวัดการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหนักของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยนำ suspension ของแบคทีเรียไปทำให้แห้งและต้องไม่ให้มีสารอื่นๆเจือปนมาด้วย suspension ที่จะนำมาหาน้ำหนักของเซลล์นั้นจะต้องมีเซลล์แบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก วิธีนี้นิยมใช้มากในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา
5. วัดปริมาณสารที่แบคทีเรียผลิตออกมา เช่น นำแบคทีเรียบางชนิดไปเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตส จะ ferment น้ำตาลให้ผลิตผลออกมาเป็นกรดหรือบางชนิด ferment น้ำตาลแล้วให้ก๊าซซึ่งก๊าซหรือกรดที่ได้นี้จะเป็สัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแบคทีเรีย กล่าวคือถ้ามีปริมาณก๊าซหรือกรดมากจะมีแบคทีเรียจำนวนมากด้วย

2.5 การสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญของจุลินทรีย์

จุลชีววิทยาพยากรณ์ทางอาหาร (Predictive food microbiological) เป็นทางเลือกหนึ่งที่คาดว่าจะมีประโยชน์เป็นอย่างมากในงานทางด้านจุลชีววิทยาอาหาร ซึ่งจะใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ (mathematical model) มาอธิบายพฤติกรรมของการเจริญ หรือการตายของจุลินทรีย์ ภายใต้เงื่อนไขการอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีปัจจัยจำเพาะที่แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ เป็นต้น จุลชีววิทยาพยากรณ์ เริ่มใช้ครั้งแรก โดย Esty และ Meyer (1922) ซึ่งเป็นผู้ที่ใช้แบบจำลอง log linear มาอธิบายถึงอัตราการตายของ *Clostridium botulinum* type A โดยใช้ความร้อนทำลายสปอร์ และใช้ประเมินระดับความร้อนที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตอาหารประเภท low-acid canned ซึ่งแบบจำลองดังกล่าว จะอธิบายอุณหภูมิที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของแบคทีเรีย ณ ช่วงเวลาหนึ่ง ต่อมา Scott (1936) ได้ดำเนินการสืบสวนหาอัตราการตายจำเพาะ ที่สัมพันธ์ กับปริมาณน้ำใช้ได้ และภายหลังได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตราการตายของจุลินทรีย์ เพิ่มเติม ซึ่งก็คือทฤษฎี ของ thermal inactivation ในปัจจุบัน และเชื่อว่าอัตราการตายจำเพาะในรูปเลขยกกำลัง จะลดลงเป็นเส้นตรงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์เพื่อทำนายอัตราการเจริญของแบคทีเรีย (Growth rate) ในอาหาร โดยทั่วไปจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ เริ่มจากการสร้างแบบจำลองการเจริญ (Growth curve) ของแบคทีเรีย ต่อสภาวะแวดล้อมที่สนใจศึกษา จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลองระดับปฐมภูมิ ในที่นี้ก็คือ อัตราการเจริญ lag time หรือ doubling time ว่ามีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะอย่างไร เมื่อมีปัจจัยกระทบในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน แล้วสร้างแบบจำลองมาอธิบาย (Mckellar and Lu, 2003)



รูปที่ 3: การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์การทำนายการเจริญของจุลินทรีย์

แบบจำลองคณิตศาสตร์ของงานจุลชีววิทยาพยากรณ์ อ้างอิงตาม Buchanan และ Whiting (1993) ประกอบด้วย 3 ระดับ คือ

1. แบบจำลองระดับปฐมภูมิ (Primary model) เป็นแบบจำลองที่อธิบายการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ ที่สัมพันธ์กับเวลา ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่จำเพาะ พารามิเตอร์ คือ อัตราการเจริญ อัตราการตาย อัตราการอยู่รอด หรือระยะเวลาของ lag phase เป็นต้น ตัวอย่างแบบจำลองระดับนี้ เช่น Gompertz functions (Gibson et al., 1987) ลักษณะแบบจำลองเป็น sigmoidal function คล้ายเส้นโค้งการเจริญของจุลินทรีย์;

$$\log x(t) = A + C \exp \{- \exp [- B(t - M)]\}$$

โดย $x(t)$ คือ จำนวนของเซลล์ที่เวลา t

A คือ จำนวนเซลล์ ณ จุดที่เมื่อ t ลดลงเป็น 0

C คือ ความต่างของจำนวนเซลล์ระหว่างจุดต่ำสุดกับสูงสุด

B คือ อัตราการเจริญที่สัมพันธ์กับ M

M คือ เวลาที่มีอัตราการเจริญสูงสุด

สมการของ Gompertz สามารถใช้วิเคราะห์ความเหมาะสมของ เส้นโค้ง การเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลาย เช่น *Yersinia enterocolitica* , *Staphylococcus aureus* , *L. monocytogenes* , *Vibrio parahaemolyticus* และ *Bacillus cereus* และสามารถปรับใช้กับเส้นโค้งการเจริญที่ได้จากข้อมูลความชื้นของเซลล์ การเกิดการเน่าเสียในผัก หรือ

เนื้อสัตว์ รวมทั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของ *Clostridium botulinum* แต่สมการของ Gompertz มีข้อจำกัด คือ อัตราการเจริญที่ได้จากสมการจะเป็นอัตราการเจริญสูงสุดเสมอ ค่า generation time จะมีค่าต่ำกว่าปกติ และค่า lag time ในข้อมูลบางชุดจะได้อัตราการเติบโต เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ ที่ $t = 0$ มีค่าต่ำกว่าระดับของจุลินทรีย์ตั้งต้น (inoculum level) อย่างไรก็ตามสมการของ Gompertz ถือเป็นสมการที่ผู้วิจัยนิยมสำหรับใช้วิเคราะห์ความเหมาะสมข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่ซับซ้อน และมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้อธิบายข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกับแบบจำลองชนิดอื่น อาทิ logistic, Richard, Schunutr and Stannard (Zwietering et al., 1990)

นอกจากนี้ยังมี แบบจำลองระดับปฐมภูมิ อีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยนำมาใช้สำหรับการศึกษาอัตราการเจริญ อัตราการตาย หรืออัตราการอยู่รอด ของจุลินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ หรือศึกษาการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน โดยสามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสม หรือข้อจำกัดของแต่ละชนิด เช่น แบบจำลองของ Baranyi model (Baranyi and Roberts, 1994) แบบจำลองของ McKellar (McKellar et al., 1997) และ Buchanan (Buchanan et al., 1997) เป็นต้น

2. แบบจำลองระดับทุติยภูมิ (Secondary model) เป็นแบบจำลองที่ได้มาจากแบบจำลองระดับปฐมภูมิ ซึ่งใช้อธิบายพารามิเตอร์การเจริญ ที่สัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมจำเพาะ ตัวอย่างเช่น Belegr'adek, classical Arrhenius equation หรือ square root type เป็นต้น แบบจำลอง Square root type หรือ Ratkowsky type เป็นแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาที่ classical Arrhenius equation ไม่สามารถใช้อธิบายผลกระทบที่เกิดจากอุณหภูมิในช่วง suboptimal ต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Ratkowsky et al., 1982) เริ่มแรกแบบจำลองชนิดนี้ใช้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของจุลินทรีย์เพียงปัจจัยเดียว จากนั้น McMeekin และคณะ (1987) นำแบบจำลองดังกล่าวมาพัฒนาใช้กับปัจจัยกระทบชนิดอื่นร่วมด้วยเพื่ออธิบายการเจริญของจุลินทรีย์ และแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้ทำนายการเจริญของ *Staphylococcus xylosus* CM21/3 ใน

สภาวะแวดล้อมที่มีปัจจัยกระทบคือ อุณหภูมิ ร่วมกับปริมาณน้ำใช้ได้อย่างเหมาะสม ได้เป็นแบบจำลอง คือ

$$\sqrt{r} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \sqrt{a_w - a_{w\min}}$$

โดย; b คือ ค่าสัมประสิทธิ์จำเพาะของแบบจำลอง

T คือ อุณหภูมิที่สนใจทำนาย T_{\min} คือ อุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้

a_w คือ ปริมาณน้ำใช้ได้ที่สนใจ $a_{w\min}$ คือ ปริมาณน้ำใช้ต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้

นอกจากนี้ Adams และคณะ (1991) ได้ใช้แบบจำลอง square root type สำหรับการทำนายการเจริญของ *Yersinia enterocolitica* โดยมีปัจจัยกระทบจากอุณหภูมิ และค่าพีเอช และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ปริมาณก๊าซบอนไดออกไซด์ กรดแลคติก เป็นต้น

3. แบบจำลองระดับตติยภูมิ (Tertiary model) เป็นแบบจำลองที่รวมข้อมูลของแบบจำลองระดับปฐมภูมิ และทุติยภูมิที่มากกว่า 1 แบบจำลองเข้าด้วยกัน โดยพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของโปรแกรมสำเร็จรูป (software) เพื่อความสะดวกในการใช้งาน เช่น USDA พัฒนาโปรแกรม Pathogen Modeling Program (PMP) สำหรับทำนายการเจริญโดยรวมรวมข้อมูลการเจริญจากการใช้สมการ Gompertz หรือในปี 1992 MAFF ได้พัฒนาโปรแกรมชื่อ Food MicroModel สำหรับใช้ในการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน

ความก้าวหน้าของงานด้านจุลชีววิทยาพยากรณ์ โดยมีงานวิจัยหลายฉบับที่มีการพัฒนาและทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับ การทำนายการเจริญ โดยศึกษาจากปัจจัยกระทบต่างๆกัน ซึ่งอุณหภูมิ ถือเป็นปัจจัยกระทบที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร ลำดับต่อมาจะเป็นค่าพีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ จากนั้นจะเป็นสารอาหารต่างๆ รวมถึงสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และ อัตราส่วนของ atmosphere ปกติอุณหภูมิมักจะถูกรควบคุมอย่างเข้มงวดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษาอาหาร แต่ไม่ได้ครอบคลุมถึง

ปัจจัยกระทบอื่นๆ ยิ่งไปกว่านั้นปัจจัยกระทบต่างๆ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงอันมีผลมาจากการเจริญของแบคทีเรียเอง หรืออาจเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วม (interaction) ระหว่างปัจจัยกระทบ หรือระหว่างอาหารกับจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์ สำหรับการทำนายควมค้ำึงการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์แบบ dynamic เพราะสถานะของอาหารสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่

Walker และคณะ (1990) ได้ศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* (ซีโรไทป์ 4b) ที่อุณหภูมิตู้เย็น (-0.5 ถึง 9.3 องศาเซลเซียส) ในอาหาร chicken broth (พีเอช 6.4) และ นม UHT (พีเอช 6.6) พบว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง -0.1 ถึง -0.4 องศาเซลเซียส ที่ 5 องศาเซลเซียส Lag time เท่ากับ 1-3 วัน และ generation time เท่ากับ 13-14 ชั่วโมง ขณะที่ 0 องศาเซลเซียส Lag time จะอยู่ระหว่าง 3 วัน จนถึง มากกว่า 34 วัน และ generation time เท่ากับ 62-131 ชั่วโมง โดยชนิดของอาหารจะมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* รวมทั้งถ้า *L.monocytogenes* มีการผ่านการบ่ม preincubation ที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ศึกษาระยะ Lag time จะลดลง

Fernandez และคณะ (1997) ได้ศึกษาอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* (ซีโรไทป์ 4b) ที่มีปัจจัยกระทบจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (0-100% v/v) ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0.5-8.0% w/v) พีเอช (4.5-7.0) และอุณหภูมิ (4-20 องศาเซลเซียส) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth สร้างเส้นโค้งการเจริญ และการหาอัตราการเจริญจำเพาะตาม แบบจำลอง ของ Baranyi และ Roberts (1994) พบว่า ปัจจัยที่ดำเนินการศึกษามีผลทำให้อัตราการเจริญระยะเวลาที่จำนวนเซลล์เพิ่มเป็น 1,000 เท่า และ doubling time จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความใช้ได้ของสมการที่ได้จากการศึกษา กับสมการอื่นที่มีการตีพิมพ์ ในวารสารเผยแพร่ พบว่าสมการการทำนายดังกล่าวมีความเหมาะสมสามารถใช้ทำนายค่าการเจริญของ

L.monocytogenes ในอาหารที่บรรจุภายใต้สภาวะ modified atmosphere ได้อย่างถูกต้อง ผลการวิจัยบ่งชี้ว่า เมื่ออุณหภูมิ พีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ ในอาหาร อยู่ในช่วงเหมาะสมต่อการเจริญ (optimal condition) จะสังเกตพบผลกระทบต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* (inhibitory effect) เมื่อร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ร้อยละความเข้มข้น 80 ขึ้นไป แต่ถ้าปัจจัยดังกล่าวอยู่ในช่วงไม่เหมาะสม (suboptimal) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ร้อยละความเข้มข้น

เท่ากับ 25 ก็จะมีผลกระทบต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ผลกระทบต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* มากกว่าความเข้มข้นของ กลีโคไซด์เดียมคลอไรด์ โดยจะเห็นว่าในสภาวะที่ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เดียวกัน และ พีเอชใกล้เคียงกัน เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนจาก 12 องศาเซลเซียส เป็น 4 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ ระยะเวลาที่จำนวนเซลล์จะเพิ่มเป็น 1,000 เท่าจากจำนวนตั้งต้นเปลี่ยนจาก น้อยกว่า 4 วัน เป็น 22 วัน ตามลำดับ แม้ว่าจะมีความเข้มข้นกลีโคไซด์เดียมคลอไรด์ที่เป็นปัจจัยร่วมในกรณีแรก สูงถึง ร้อยละ 8 ขณะที่ในกรณีที่สองมีเพียงร้อยละ 0.5

Miles และคณะ (1997) ได้ทำการพัฒนา และประเมินผลแบบจำลองการทำนายสำหรับ อัตราการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* 4 สายพันธุ์ โดยมีปัจจัยกระทบเป็นอุณหภูมิ และ ปริมาณน้ำใช้ได้ ซึ่งใช้ square root model สรุปว่าแบบจำลองดังกล่าวสามารถใช้ทำนาย generation time ของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เจริญอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ ช่วงระหว่าง 8 ถึง 45 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ ในช่วง 0.936 ถึง 0.995 ได้ ซึ่งมีค่า bias factor เท่ากับ 1.01 และ accuracy factor เท่ากับ 1.38 วิเคราะห์ความเหมาะสมของอัตราการเจริญจำเพาะ ของ *Vibrio parahaemolyticus* ตามสมการของ Gompertz และหาค่า T_{min} ได้เท่ากับ 278.5, 279.9, 280.7 และ 278.1 ค่า a_{wmin} เท่ากับ 0.921, 0.926 และ 0.937 ของ *Vibrio parahaemolyticus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ตามลำดับ

Nyati (2000) ศึกษาการรอดชีวิต (survival) และการทำนายอัตรา การเจริญ ของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่าน กระบวนการพาสเจอร์ไรด์ โดยเทคโนโลยี sous vide และในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth พบว่า *L.monocytogenes* ใน tryptose phosphate broth ตัวอย่างเนื้อไก่ และเนื้อวัว ที่เก็บแบบสภาวะไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ 2 log ในเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส และ 4-5 log ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาการประยุกต์ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ เพื่อทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามแบบจำลองของ Ratkowsky และคณะ (1982) ซึ่งพบว่า square root model สามารถทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่ 0-25 องศาเซลเซียส ใน tryptose phosphate broth ตัวอย่างเนื้อไก่ และเนื้อวัวได้ โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 98.36-99.63 เปอร์เซนต์ และค่า bias factor เท่ากับ 1.08 ถึง 1.21

Wei และ Fang (2001) ทำการทวนสอบแบบจำลองการเจริญของ *L.monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* ในเนื้อไก่สุก ที่อุณหภูมิ 4-34 องศาเซลเซียส ตามแบบจำลองของ Zwietering (1990) โดยวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลองสำหรับใช้ทำนายอัตราการเจริญ จากค่า mean square error , regression coefficient , bias factor และ accuracy factor พบว่า โมเดลที่ได้มีความเหมาะสมในการใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* ในเนื้อไก่สุก และไม่พบการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุกที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ *Yersinia enterocolitica* เป็นจุลินทรีย์แข่งขันมีผลไปยังการ เจริญของ *L.monocytogenes* ในช่วงอุณหภูมิ 10-34 องศาเซลเซียส

Carrasco และคณะ (2006) ดำเนินการพัฒนาแบบจำลองสำหรับการทำนายอัตราการ เจริญของ *L.monocytogenes* สายพันธุ์ NCTC 11944 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ และชนิดกรดที่ แตกต่างกัน โดยศึกษาอุณหภูมิ ที่ 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับ กรดซิตริก ความเข้มข้น (0-0.4% w/v) และกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth ซึ่งกรดทั้งสองชนิดมักจะใช้เป็นสารถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหาร แล้ววิเคราะห์ความเหมาะสมของเส้นโค้งการเจริญ และหาค่าอัตราการเจริญตามสมการของ Baranyi และ Roberts (1994) แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้ ประเมินค่าทางสถิติ โดยค่า RMSE เท่ากับ 0.04 ค่า Bias factor เท่ากับ 1.05 ค่า Accuracy factor เท่ากับ 1.16 และมีค่า standard error ของการทำนาย เท่ากับ 18.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับสามารถใช้ทำนายอัตราการ เจริญของ *L.monocytogenes* ในสภาวะที่ศึกษาได้

McClure และคณะ (1997) ศึกษาผลกระทบของ NaCl (5.0-115.0 g/l) ค่าพีเอช (4.0-7.2) อุณหภูมิ (1-35 องศาเซลเซียส) และ NaNO_2 (0-200 mg/l) ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ความเหมาะสมของเส้นโค้งการเจริญตามสมการ ของ Baranyi และ Roberts (1994) และสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนาย ตาม แบบ quadratic polynomial โดยทวนสอบความใช้ได้ของแบบจำลองจากข้อมูลอัตราการเจริญ , lag time, doubling time และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มเป็น 1,000 เท่า ในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื้อสัตว์ นม และผัก จากเอกสารตีพิมพ์ต่างๆ ซึ่งจะเปรียบเทียบกับแบบจำลองของ Buchanan และ Phillips (1990) Murphy และคณะ (1996) และโปรแกรม Food MicroModel พบว่า สมการ

Gompertz และ Baranyi ทำนาย doubling time ได้ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการทดลองในอาหาร (อัตราการเจริญจะเร็วกว่า) ขณะที่แบบจำลองการทำนายที่ได้จากการศึกษาจะให้ค่าการทำนายใกล้เคียงกับค่าจากการทดลองเป็นอย่างมาก เท่ากับ 4.49 เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองของ Buchanan และ Phillips (1990) เท่ากับ 23.22 Murphy และคณะ (1996) เท่ากับ 7.73 และโปรแกรม Food MicroModel เท่ากับ 28.23 ซึ่งทั้งหมดจะให้ค่าการทำนายสูงกว่าค่าจากการทดลอง แต่ยังคงอยู่ในขอบเขตการยอมรับ

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญ

1. Lag phase duration : ที่ผ่านมานักวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง แบบจำลองเพื่อทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* จะศึกษาจากเซลล์ตั้งต้น (prior state) ที่เจริญอยู่ในระยะ stationary phase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Buchanan and Klawitter, 1991; Whiting and Bagi, 2000) แต่มีข้อมูลบ่งชี้ว่าช่วงเวลาของ Lag phase ของการเจริญมีความสำคัญสำหรับการทำนายการเจริญของแบคทีเรีย การออกแบบแบบจำลอง และการประเมินความเสี่ยง โดย Whiting และ Bagi (2002) ได้ศึกษาระยะเวลาของ Lag phase ของ *L.monocytogenes* โดยใช้เซลล์ตั้งต้นที่มาจากสภาวะต่างๆ พบว่า ถ้าจะศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่ช่วงอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) แต่ใช้เซลล์ตั้งต้นที่บ่มผ่านอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมาก่อน (T_{prior}) จะมี Lag phase ที่นานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ การบ่มผ่านอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปเซลล์ตั้งต้นที่เจริญอยู่ในระยะ exponential จะมีระยะเวลาของ Lag phase สั้นกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary และเซลล์ที่เจริญอยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (starved cell) ส่วนเซลล์ตั้งต้นที่ผ่านการแช่แข็งจะมี ระยะเวลาของ Lag phase เพิ่มขึ้น ขณะที่เซลล์ที่ผ่านการทำแห้ง (desiccated cell) จะมีช่วงเวลาของ Lag phase นานที่สุด
2. จำนวนเซลล์ตั้งต้น (Initial inoculum level) : ก่อนหน้านี้นักงานด้านจุลชีววิทยาพยากรณ์ ไม่ได้คำนึงถึงความสำคัญของจำนวนเซลล์ตั้งต้น เนื่องจากเชื่อว่าจะไม่มีผลกระทบต่อ การเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่ง Duffy และคณะ (1994) ได้ยืนยันสมมุติฐานดังกล่าวว่าจำนวน *L.monocytogenes* ตั้งต้นไม่มีผลต่อการเจริญ แต่ Gay และคณะ (1996) สังเกตพบว่า

จำนวนเซลล์ตั้งต้น มีผลต่อระยะ Lag phase ของ *L.monocytogenes* ภายใต้สภาวะการเจริญใน soft cheese จากข้อสังเกตนี้ทำให้เกิดข้อขัดแย้งต่อ ความถูกต้องของแบบจำลองการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ ที่สร้างมาจากข้อมูลการเจริญที่ใช้จำนวนเซลล์ตั้งต้นสูงกว่า 10^3 cfu/ml และในความเป็นจริงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารปกติคาดว่าจะเป็นอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ซึ่งมีงานวิจัยอื่นที่สนับสนุนข้อสังเกตนี้ โดยพบว่า จำนวนเซลล์ตั้งต้นของ *Bacillus* หรือ *Salmonella* มีผลต่อระยะ Lag phase แต่จะสังเกตพบกรณีนี้ที่ศึกษาในสภาวะที่เป็น suboptimal เท่านั้น เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่สมบูรณ์ (poor medium) หรือเป็น heat-injured cell เป็นต้น (Lankford et al.,1966; Stephens et al.,1997) ต่อมา Augustin และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสำคัญของจำนวนเซลล์ตั้งต้นของ *L.monocytogenes* ว่ามีผลกระทบต่อ Lag phase อย่างไร โดยศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* ใน poor medium pH 6 ภายใต้สภาวะ suboptimal ที่อุณหภูมิ 6.5 องศาเซลเซียส และใช้เซลล์ที่กระตุ้นให้อยู่ในภาวะขาดแคลนอาหาร (starvation) พบว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้นจะมีผลกระทบต่อ Lag phase โดยทำให้ lag phase เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะที่เซลล์ *L.monocytogenes* ถูกกระตุ้นให้อยู่ภาวะเครียดเท่านั้น (ขาดแคลนอาหารมากกว่า 160 ชั่วโมง) ด้วยเหตุนี้การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนต่ำควรจะสัมพันธ์กับ stochastic model โดยเฉพาะถ้าเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะเป็น injured cell

3. Preincubation effect : มีงานวิจัยหลายฉบับที่กล่าวถึงผลของ preincubation ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ถ้าสิ่งแวดล้อมเดิมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ก่อนเปลี่ยนสิ่งแวดล้อมใหม่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกันจุลินทรีย์จะใช้เวลาในการปรับสภาพก่อนเจริญเพิ่มจำนวนน้อยลง กล่าวคือ *L.monocytogenes* จะมีระยะ Lag phase ของการเจริญในอุณหภูมิที่ต่ำลง ถ้าผ่านการ preincubation ที่อุณหภูมิต่ำมาก่อน เมื่อเทียบกับอุณหภูมิสูง (Buchanan and Klawitter,1991; Gay et al.,1996; Membre et al,1999; Augustin et al.,2000a; Dyhes,2003; Mellefont and Ross,2003) นอกจากนี้ Francois และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ และค่าพีเอช ที่ใช้ preincubation ต่อระยะ Lag

phase ของ *L.monocytogenes* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส พบว่า Lag phase การเจริญที่ 7 องศาเซลเซียส ของ *L.monocytogenes* จะเพิ่มมากขึ้น ถ้าอุณหภูมิสำหรับ preincubation เท่ากับ 37, 15 หรือ 10 องศาเซลเซียส แต่จะไม่มีระยะ Lag phase ถ้าอุณหภูมิสำหรับ preincubation เท่ากับ 7, 4 หรือ 2 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับผลกระทบจากค่าพีเอช ถ้าเปลี่ยนจากค่าพีเอชสูงไปต่ำก็จะมี lag phase เพิ่มขึ้น

4. Change Temperature (T_c) : จากที่ Bajard และคณะ (1996) ได้ศึกษาพฤติกรรมเฉพาะของ *L.monocytogenes* ที่เจริญภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (sub-optimal temperature) โดยหาอัตราการเจริญ (μ_{max}) ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ -2 ถึง 42 องศาเซลเซียส ในอาหาร Mueller Hinton broth โดยใช้สมการ linear regression จากการสร้างเส้นโค้งความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า μ_{max} กับอุณหภูมิ จะได้ค่าอุณหภูมิต่ำสุด อุณหภูมิสูงสุด และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ -3, 43 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Rosso et al,1993) แต่พบว่า $\sqrt{\mu_{max}}$ ของ *L.monocytogenes* อาจไม่มีความสัมพันธ์ เป็นเส้นตรงทั้งหมดของช่วงอุณหภูมิที่สามารถ เจริญได้ (-2 ถึง 42 องศาเซลเซียส) เนื่องจากเมื่อสร้างเส้นโค้งความสัมพันธ์ระหว่าง $\sqrt{\mu_{max}}$ และอุณหภูมิ แล้ว fit ด้วย linear model ปรากฏว่ามีบางค่าที่อยู่ในช่วง 95% confidence interval ของ $\sqrt{\mu_{max}}$ ไม่อยู่บนเส้น regression line $\sqrt{\mu_{max}}$ ของ *L.monocytogenes* ที่สภาวะ suboptimal temperature มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับอุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส ถ้าต่ำกว่านี้ slope ของสมการจะเปลี่ยนไป จึงบ่งชี้ว่าช่วงระหว่างอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส เป็นจุดที่เรียกว่า “change temperature” ซึ่งพฤติกรรมการเจริญของ *L.monocytogenes* ลักษณะนี้เป็นสิ่งที่ผู้วิจัยต้องให้ความสำคัญเมื่อมีการศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* ในสภาวะที่เป็น suboptimal เนื่องจากจะมีผลต่อค่าประมาณหาค่า T_{min} ของชุดข้อมูล และที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า T_c อัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* จะเร็วกว่าที่ประเมินไว้
5. Food structure : จากการศึกษาอิทธิพลของ food structure และ cell immobilize ต่อพฤติกรรมการเจริญของจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะการ

สร้างโคโลนี (surface growth) จะถูกจำกัด และเจริญได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญในลักษณะเป็น planktonic growth (Brocklehurst et al.,1997; Stechini et al.,1998; Skandamis et al.,2000; Wilson et al.,2002; Meldrum et al.,2003) ซึ่งคาดว่าอาจจะมีสาเหตุจาก คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ ความสามารถในการดูดซึมอาหาร ความสามารถในการใช้อากาศ หรือการติดต่อระหว่างเซลล์กับเซลล์ (cell to cell communication) (Fuqua et al.,1994; Walker et al.,1997; Yoon et al.,2003) จึงคาดว่า structure ของอาหารมีผลต่อการสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ แม้ว่า te Giffel และ Zwietering (1999) จะบ่งชี้ว่าแบบจำลองที่ศึกษาข้อมูลการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อของห้องปฏิบัติการ (broth) สามารถใช้ทำนายการเจริญได้อย่างถูกต้องในอาหารบางชนิด นอกจากนี้ Koutsoumanis และคณะ (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบสภาวะจำกัดการเจริญ (growth limit) ของ *L.monocytogenes* จากอุณหภูมิ ช่วง 4-30 องศาเซลเซียส พีเอช ช่วง 4.24-6.58 และปริมาณน้ำใช้ได้ ช่วง 0.900-0.993 เมื่ออยู่ในของเหลว (suspension) และบน solid surface พบว่า *L.monocytogenes* มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งใน suspension และ solid surface แต่การเจริญบน solid surface จะมีขอบเขตการจำกัดการเจริญมากกว่า (limites of growth) จะเห็นได้จากที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ใน suspension ที่ pH ต่ำสุดเท่ากับ 4.45 และปริมาณน้ำใช้ได้ต่ำสุดเท่ากับ 0.900 ขณะที่ใน solid surface จะเจริญได้ที่ pH ต่ำสุด เท่ากับ 5.10 และ ปริมาณน้ำใช้ได้ต่ำสุด เท่ากับ 0.945

2.7 การประยุกต์ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร

Ross และ McMeekin (1994) นำเสนอว่าแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายที่พัฒนาขึ้นอย่างเป็นระบบ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านความปลอดภัยอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์เพื่อทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแล้วแต่สามารถเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ศึกษาปัจจัยกระทบต่างๆ เช่น ปริมาณน้ำใช้ได้ ค่าพีเอช สารถนอมอาหาร ปริมาณอากาศ แม้กระทั่งลักษณะการบรรจุอาหาร ที่จะมีผลต่อ thermal inactivation kinetic ของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารอีกด้วย (Horner et al.,1975; McMahan et al.,1999; Chhabra et al.,1999, 2002; Linton et al.,1995, 1996; Augustin et al.,1998; Gaillard et al.,1998; Murphy et al.,2004; Membre et al.,2006; Valdramidis et al.,2006; Fernandez et al.,2007; Shabala et al.,2008) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ มีความสำคัญสำหรับการเลือกวิธีการให้ความร้อนกับอาหารที่เหมาะสมที่สุดเพื่อกำจัดโอกาสการพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหลังผ่านกระบวนการปรุงสุก

แบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายจำนวนจุลินทรีย์ล่องหน้า สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ระยะความปลอดภัย จากจุลินทรีย์ก่อโรค และ อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ค่อนข้างซับซ้อน เนื่องจากความหลากหลายของส่วนประกอบของอาหารที่เป็นปัจจัยกระทบต่อการเจริญ และความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่มีโอกาสปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร (Banks, 1994; Vankerschaver et al.,1996; Kant-Muermans et al., 1997; Neumeyer et al.,1997a,b; Devlieghere et al.,1999) หรือนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาจุดวิกฤต (critical control point) การทวนสอบ และการปรับปรุงโปรแกรม HACCP ของกระบวนการผลิตอาหาร (Broughall and Brown,1984; Roberts,1989; McMeekin et al.,1992; Bachanan and Whiting,1996; Elliott,1996) รวมถึงนำไปใช้ในกระบวนการประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์ในอาหาร เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดการเจ็บป่วยอันเกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคในห่วงโซ่การผลิต (Walls and Scott,1997a, 1997b) หรือการออกแบบการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ระดับห้องปฏิบัติการ เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มี วัตถุประสงค์ที่จะ พัฒนา และทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์ สำหรับผลของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เพื่อทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินการศึกษาวิจัย ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การสำรวจหา *L.monocytogenes* เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

ขั้นตอนที่ 2: การผลของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

ขั้นตอนที่ 3: การทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

ขั้นตอนที่ 4: การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ได้จากขั้นตอนที่ 3

ขั้นตอนที่ 5: สร้างแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

ขั้นตอนที่ 6: การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

3.1 การสำรวจหา *L. monocytogenes* จากเนื้อไก่ดิบ เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบ

3.1.1 วัตถุประสงค์

ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อไก่ดิบจากโรงงานชำแหละ เช่น ปีก น่อง เนื้ออก โดยเก็บในขั้นตอนการตัดแต่งชิ้นเนื้อแล้วในกระบวนการผลิตขั้นสุดท้ายก่อนการบรรจุ จากนั้นนำไปเพาะแยก *L. monocytogenes* ตามวิธีทดสอบมาตรฐาน อ้างอิงตาม ISO 11290-1:1996

3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.2.1 Sterile pipette ขนาด 1 ml

- 3.1.2.2 Pipette aid
 - 3.1.2.3 ตะเกียงแก๊ส
 - 3.1.2.4 Loop และ Needle
 - 3.1.2.5 แผ่นกระจกสไลด์
 - 3.1.2.6 ปากคีบ และ กรรไกร
 - 3.1.2.7 ถังพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง
 - 3.1.2.8 ชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง
 - 3.1.2.9 Incubator อุณหภูมิ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)
 - 3.1.2.10 Incubator อุณหภูมิ $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)
 - 3.1.2.11 Incubator อุณหภูมิ $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)
 - 3.1.2.12 Incubator อุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)
 - 3.1.2.13 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS, JAPAN)
 - 3.1.2.14 เครื่อง Stomacher (รุ่น 1400, SEWARD MEDICAL, LONDON)
- 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
- 3.1.3.1 Listeria Enrichment broth base (UVM broth)
 - 3.1.3.2 Fraser broth
 - 3.1.3.3 Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA)
 - 3.1.3.4 Oxford agar
 - 3.1.3.5 Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA)
 - 3.1.3.6 Tryptone Soya Yeast Extract Broth (TSYEB)
 - 3.1.3.7 Sheep Blood Agar
 - 3.1.3.8 Phenol red broth base
 - 3.1.3.9 Xylose และ Rhamnose
 - 3.1.3.10 CAMP medium
 - 3.1.3.11 Hydrogen peroxide solution

3.1.4 วิธีทดสอบ

3.1.4.1 ตัดตัวอย่างชิ้นส่วนไก่สด แล้วชั่งให้ได้ $25 \text{ g} \pm 0.25 \text{ g}$. ใส่ถุงพลาสติกปิดปราศจากเชื้อ เท UVM broth ปริมาตร 225 ml. นำไปตีโดยเครื่อง Stomacher ที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ประมาณ 15-30 วินาที จากนั้นนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.

3.1.4.2 เมื่อครบเวลาให้ถ่ายตัวอย่างที่ผ่านการบ่ม มา 0.1 ml. ใส่ลงใน Fraser broth ปริมาตร 10 ml แล้วนำเข้า บ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชม.

3.1.4.3 เมื่อครบเวลาให้ใช้ loop ถ่ายตัวอย่างมา S streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA plate และ Oxford agar plate ชนิดละ 1 loop นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ และ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ตามลำดับ อ่านผลที่ 24 ± 3 ชม. หากไม่พบมีการเจริญของเชื้อหรือเชื้อเจริญน้อย ให้บ่มต่ออีก 24 ± 3 ชม.

3.1.4.4 เมื่อครบเวลานำมาตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และ Oxford ซึ่งมีลักษณะดังนี้

ALOA : โคโลนีกลม สีเขียวอมฟ้า เกิดหรือไม่เกิดโซนล้อมรอบโคโลนี

Oxford : ที่ 24 ชั่วโมง โคโลนีสีเทา ขนาด 1 มม. รอบๆโคโลนีมีสีดำ

ที่ 48 ชั่วโมง โคโลนีจะสีเข้มขึ้น หรืออาจมีสีเขียว ขนาด

ประมาณ 2 มม. รอบๆโคโลนีมีสีดำ และ ตรงกลางโคโลนีนุ่ม

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะตามข้างต้นจาก ALOA และ Oxford ชนิดละ 3

โคโลนี มา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA plate นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.

3.1.4.5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผล *L. monocytogenes*

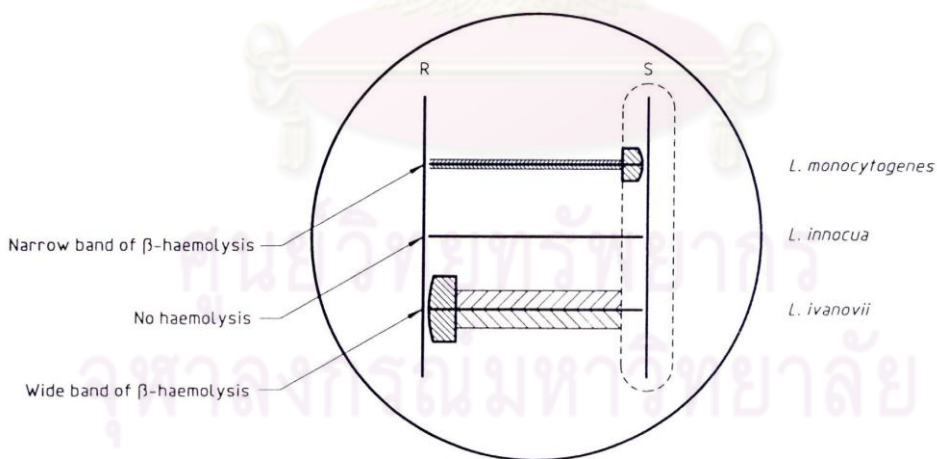
3.1.4.5.1 Catalase test หยด 3 % Hydrogen peroxide solution ลงบนกระจกสไลด์ เชื้อเชื้อที่จะทดสอบมาเกลี่ยผสมให้เข้ากัน สังเกตการเกิดฟองแก๊ส หากเกิดฟองแก๊สภายใน 5 วินาทีให้ผลเป็นบวก

- 3.1.4.5.2 การย้อมแกรม (Gram ' stain) เชียเชื้อที่จะทดสอบนำไปย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของเซลล์ ซึ่งลักษณะของเชื้อ *L. monocytogenes* จะติดสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อชนิดแกรมบวก รูปร่างเป็นแบบท่อนสั้น
- 3.1.4.5.3 Motility test ใช้ needle เชียเชื้อจากที่จะทดสอบใส่ลงใน Motility agar โดยวิธีการ stab ลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเข้าบ่มที่ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชม. แล้วนำมาสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ โดยเชื้อ *L. monocytogenes* จะเจริญออกตามรอย s tab แล้วแพร่ออกจากรอย stab มีลักษณะคล้ายร่ม (Umbrella-like)
- 3.1.4.5.4 Haemolysis test ใช้ Loop เชียเชื้อที่จะทดสอบมา streak ลงบน Sheep blood agar นำเข้าบ่มที่ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. เพื่อทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง สังเกตการเกิด clear zone รอบๆโคโลนีของเชื้อที่เจริญ ซึ่งเชื้อ *L. monocytogenes* มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -haemolysis
- 3.1.4.5.5 Carbohydrate utilization ใช้ Loop เชียเชื้อที่จะทดสอบลงใน Phenol red broth ที่ผสมน้ำตาล Xylose และ Phenol red broth ที่ผสมน้ำตาล R hamnose นำเข้าบ่มที่ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24-48 ชม. ชม. สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ carbohydrate ชนิดนั้นๆได้ ซึ่งเชื้อ *L. monocytogenes* มีคุณสมบัติสามารถใช้น้ำตาล R hamnose ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ผสมน้ำตาล Rhamnose เปลี่ยนเป็นสีเหลือง
- 3.1.4.5.6 CAMP test ใช้ Needle เชียเชื้อ *S. aureus* และ *R. equi* ขีดแบบ single line ลงบน CAMP medium โดยขีดให้เชื้อทั้ง 2

ชนิดอยู่ในด้านตรงกันข้ามกันในลักษณะคู่ขนาน ให้เชื้อ *R. equi* อยู่ด้านซ้าย และเชื้อ *S. aureus* อยู่ด้านขวา จากนั้นเขียนเชื้อที่จะทดสอบ มาขีดลากจากด้านเชื้อ *R. equi* ไปทางเชื้อ *S. aureus* และให้มีระยะห่างจากเชื้อ *R. equi* และ *S. aureus* ประมาณ 1-2 mm. ตามรูปที่ 4 นำเข้าบ่มที่ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 ± 3 ชม. นำมาสังเกตผลการทดสอบ ซึ่งผลการทดสอบเป็นดังนี้

Positive reaction กับ *R. equi* เกิด β -haemolysis คล้ายหัวลูกศรกว้างประมาณ 5-10 mm.
ทางด้านเชื้อ *R. equi*

Positive reaction กับ *S. aureus* เกิด β -haemolysis คล้ายหัวลูกศรกว้างประมาณ 2 mm.
ทางด้านเชื้อ *S. aureus*



รูปที่ 4 : แสดงการทดสอบ CAMP Test ของ *L. monocytogenes*

3.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญเติบโต ของ

L. monocytogenes ในเนื้อไก่ปรุงสุก

- 3.2.1 ตัดชิ้นเนื้อไก่สดให้มีน้ำหนักประมาณ 25 ± 1.0 กรัม เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในตัวอย่าง ที่ร้อยละความเข้มข้นเท่ากับ 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 ตามลำดับ จากนั้นนำเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
- 3.2.2 นำไปทำให้สุกโดยการจุ่มลงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และให้มีอุณหภูมิตรงจุดกลางชิ้นเนื้อไก่ไม่ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 นาที นำแต่ละชุดความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ไปวัดค่าปริมาณน้ำใช้ได้ หากยังไม่ทดสอบทันทีให้เก็บเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อนแล้วไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ
- 3.2.3 หยด *L. monocytogenes* ลงบนผิวหน้าเนื้อไก่สุกให้ได้ 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง โดยคำนวณจากปริมาณสารละลายเจือจาง (diluent) ที่เติมในตัวอย่างทดสอบ
- 3.2.4 นำตัวอย่างไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 , 10 , 15 , 20 และ 25 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างแต่ละคู่ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ชั่วโมงต่างๆ เพื่อมาตรวจนับจำนวน *L. monocytogenes* ที่เจริญ จนกระทั่ง *L. monocytogenes* เจริญเข้าสู่ระยะ death phase
- 3.2.5 การตรวจนับจำนวน *L. monocytogenes* โดยนำตัวอย่างเนื้อไก่ทั้ง 25 กรัมมาเติม Buffer peptone broth 225 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางตัวอย่างตามความเหมาะสม ดูดสารละลายตัวอย่างแต่ละลำดับการเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบน ALOA plate จำนวน 2 เพลทต่อลำดับความเจือจาง เกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้ว นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของ *L. monocytogenes* ที่เจริญบน ALOA โดยเลือกเพลทที่มีจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วงไม่เกิน 300 โคโลนี
- 3.2.6 สร้างเส้นโค้งการเจริญเติบโต (Growth curve) ระหว่างเวลากับจำนวนเชื้อ ในหน่วยของเลขยกกำลัง แล้วคำนวณอัตราการเจริญของเชื้อ (r) ในแต่ละคู่ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียม ตามสมการของ Gompertz

$$\log x(t) = A + C \exp \{-\exp[-B(t-M)]\} \quad (3.2.6.1)$$

$$\text{Growth rate } (r) = BC/2.718 \quad (3.2.6.2)$$

โดย	$x(t)$	คือ	จำนวนของเซลล์ที่เวลา t
	A	คือ	จำนวนเซลล์ ณ จุดที่เมื่อ t ลดลงเป็น 0
	C	คือ	ความต่างของจำนวนเซลล์ระหว่างจุดต่ำสุดกับสูงสุด
	B	คือ	อัตราการเจริญที่สัมพันธ์กับ M
	M	คือ	เวลาที่มีอัตราการเจริญสูงสุด

ดังนั้น จะได้อัตราการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* จำนวน 25 ค่า ในแต่ละคู่ของอุณหภูมิและความเข้มข้นเกลือไฮเดียมคลอไรด์ และแต่ละคู่การทดสอบจะทำศึกษา 3 ซ้ำ (Replication)

3.3 ทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

3.3.1 สร้างเส้นโค้ง (curve) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และค่า \sqrt{r} ณ ค่าปริมาณน้ำใช้ได้หนึ่งๆ ดังสมการ

$$\sqrt{r} = b(T - T_{\min}) \quad (1)$$

3.3.2 วิเคราะห์ความเหมาะสมในการใช้ สมการเส้นตรง (linear equation) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่า \sqrt{r} โดยการประเมินค่า Root mean square error (RMSE) โดยที่ค่า RMSE ที่น้อย หมายความว่า สมการเส้นตรงมีความเหมาะสมในการอธิบายความสัมพันธ์ได้ดี

3.3.3 ซึ่งจากเส้นโค้งที่ได้จากสมการที่ (1) ทำให้สามารถวิเคราะห์หาอุณหภูมิต่ำสุด (T_{\min}) ที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้

3.4 ทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำใช้ได้ และ ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของ สมการที่ (1)

- 3.4.1 สร้างเส้นโค้ง (curve) ความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และค่า b จากสมการที่ (1) ในรูปของ b^2
- 3.4.2 วิเคราะห์ความเหมาะสมในการใช้ สมการเส้นตรง (linear equation) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และค่า b^2 โดยการประเมินค่า RMSE
- 3.4.3 สมการความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และค่า b ในรูปของ b^2 จากสมการที่ (1) คือ

$$b = \beta \sqrt{a_w} \quad (2)$$

โดยที่ b คือ สัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (1)

β คือ regression coefficient หรือ สัมประสิทธิ์ถดถอย

ซึ่งจากเส้นโค้งที่ได้จากสมการที่ (2) นี้เอง ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณน้ำใช้ได้ต่ำสุด (a_{wmin}) ที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญเติบโตได้ด้วย

3.5 สร้างแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

- 3.5.1 เมื่อแทนที่ b ในสมการที่ (1) ด้วยสมการที่ (2) จะได้แบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes*

$$\sqrt{r} = \beta \cdot \sqrt{a_w - a_{wmin}} \cdot (T - T_{min}) \quad (3)$$

- 3.5.2 จากสมการที่ (3) ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ สามารถสร้างเส้นโค้ง (curve) ความสัมพันธ์ระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$ ซึ่งทำให้สมการที่ 3 เหลือตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว คือ $\sqrt{a_w}$ ได้เป็น

$$\sqrt{r} = \beta \sqrt{a_w - a_{wmin}} \quad (4)$$

โดยที่ ค่า a_{wmin} วิเคราะห์ได้จากการศึกษาข้อ 3.4

3.5.3 จากสมการที่ (4) วิเคราะห์ความเหมาะสมในการใช้สมการเส้นตรง (linear equation) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง $\sqrt{a_w}$ และ \sqrt{r} โดยการประเมินค่า RMSE

3.6 ทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก

ดำเนินการทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุกโดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากแบบจำลอง กับค่าที่ได้จากการทดลอง โดยการประเมินจากค่า RMSE, Bias factor และ Accuracy factor กล่าวคือ

ค่า Bias factor ไม่เกิน 1 หมายความว่า แบบจำลองสามารถทำนายค่าได้

คำนวณจาก :

$$\text{Bias factor (Bf)} = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\hat{y}}{y_i}\right)}{n} \right)}$$

ค่า Accuracy factor เข้าใกล้ 1 หมายความว่า แบบจำลองสามารถทำนายค่าได้อย่างถูกต้อง

คำนวณจาก :

$$\text{Accuracy factor (Af)} = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\hat{y}}{y_i}\right)}{n} \right)}$$

โดย \hat{y} คือ อัตราการเจริญที่ได้จากผลการทดลอง

y คือ อัตราการเจริญที่ได้จากการทำนายด้วยแลลจำลองคณิตศาสตร์

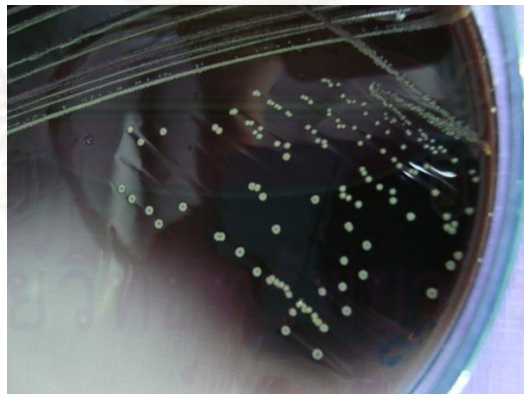
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

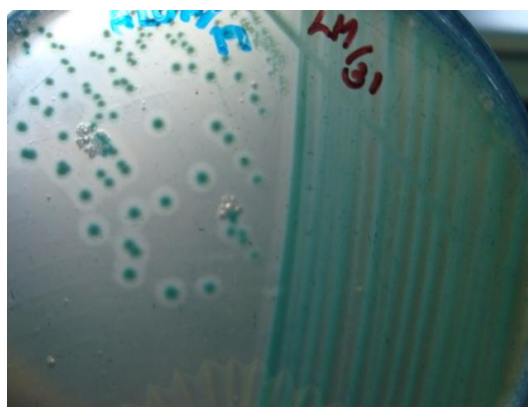
การศึกษาผลของอุณหภูมิ ร่วมกับความเข้มข้นกลีเซอรีนต่อการเจริญของ *L. monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก สำหรับการพัฒนา และทดสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์เพื่อใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *L. monocytogenes* ซึ่งผลการศึกษาประกอบด้วยรายละเอียดดังนี้

4.1 การสำรวจหา *L.monocytogenes* จากเนื้อไก่ดิบ เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

จากการสุ่มตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อไก่ดิบ เพื่อแยกหา *L.monocytogenes* ตามวิธีมาตรฐาน ISO 11290-1:1996 พบลักษณะโคโลนี เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด oxford ที่ 24 ชั่วโมง โคโลนี มีสีเทา ขนาด 1 มิลลิเมตร รอบๆโคโลนีมีสีดำ หลังจาก 48 ชั่วโมง โคโลนีจะสีเข้มขึ้น ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร รอบๆโคโลนีมีสีดำ ตรงกลางโคโลนีนุ่ม (ตามรูปที่ 5) และ บน ALOA โคโลนีรูปร่างกลม สีเขียวอมฟ้า เกิดโซนล้อมรอบโคโลนี (ตามรูปที่ 6)



รูปที่ 5 : ลักษณะโคโลนีของ *L.monocytogenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ oxford agar

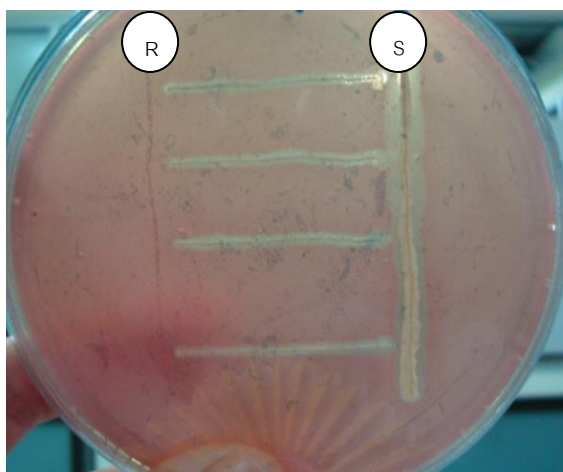


รูปที่ 6 : ลักษณะโคโลนีของ *L.monocytogenes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA agar

จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่สงสัย (suspected colony) บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 : แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ suspected colony

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Catalase test	ให้ผลเป็นบวก
Gram's stain	ติดสีม่วงน้ำเงิน เป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแบบท่อนสั้น
Motility test	มีการเคลื่อนที่ลักษณะคล้ายร่ม (Umbrella-like)
Haemolysis test	สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -haemolysis
Carbohydrate utilization	ใช้น้ำตาล Rhamnose โดยเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด
CAMP test	เกิด β -haemolysis คล้ายหัวลูกศรกว้างประมาณ 2 mm. ทางด้านเชื้อ <i>S. aureus</i> (รูปที่ 7)

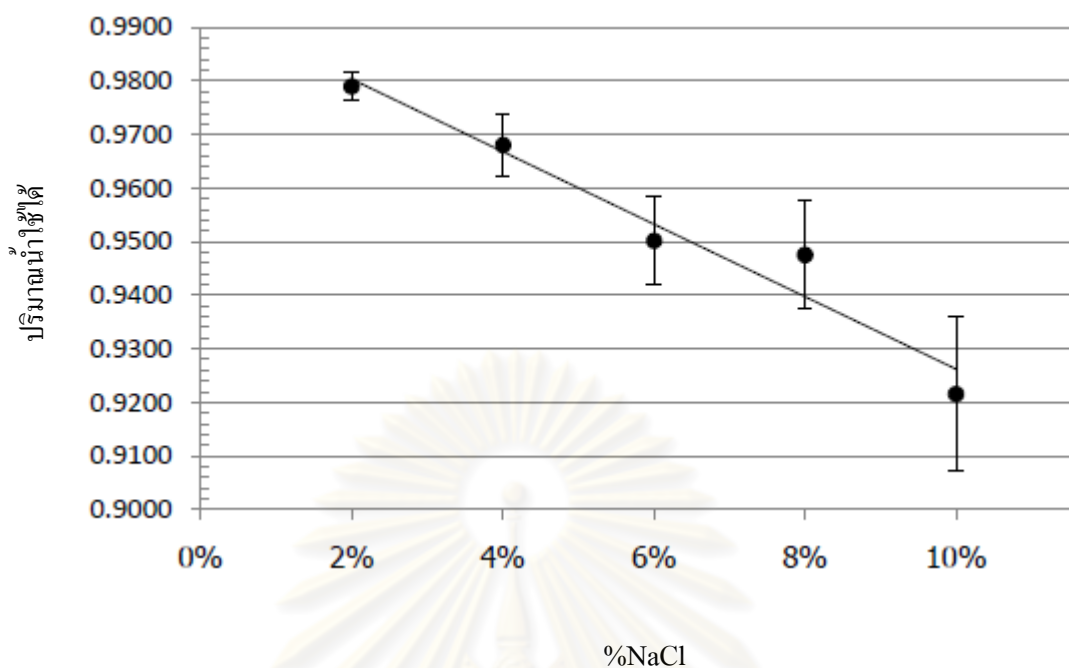


รูปที่ 7: ลักษณะการแสดงผลการทดสอบ CAMP ของ *L.monocytogenes*

จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ในตารางที่ 7 สามารถยืนยันได้ว่าไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อไก่ดิบ เป็น *Listeria monocytogenes*

4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก

เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่แต่ละความเข้มข้น เมื่อนำไปวัดค่าปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity) ในเนื้อไก่ ด้วยเครื่อง AQUALAB model series 38 3TB จะได้ค่าเฉลี่ยที่ร้อยละความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 เท่ากับ 0.979, 0.968, 0.950, 0.947 และ 0.921 ตามลำดับ สามารถอธิบายได้ว่า เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ร้อยละความเข้มข้นของน้ำหนักเพิ่มขึ้น จะทำให้ปริมาณน้ำได้ในเนื้อไก่ลดลง ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำใช้ได้ในเนื้อไก่ปรุงสุก หลังเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ร้อยละความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 2-10)

จากการศึกษาอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ที่มีปัจจัยกระทบจาก อุณหภูมิ ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งอุณหภูมิที่ดำเนินการศึกษา คือ 5, 10, 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส และเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ร้อยละความเข้มข้นเท่ากับ 2, 4, 6, 8 และ 10 ของ น้ำหนักเนื้อไก่ โดยการสร้างเส้นโค้งการเจริญ (Growth curve) ระหว่างเวลากับจำนวน *L.monocytogenes* ในหน่วยของเลขยกกำลัง ของแต่ละคู่ ปัจจัย แล้วดำเนินการประเมิน ค่าพารามิเตอร์ตามสมการของ Gompertz เพื่อวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ในแต่ละสภาวะการทดสอบ ซึ่งประเมินจากค่า RMSE พบว่า สมการของ Gompertz สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของจำนวน *L.monocytogenes* ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับเวลา ได้ดี มีค่า RMSE อยู่ระหว่าง 0.2-0.5 ดังรายละเอียดตามตารางที่ 8 ถึง 12

ตารางที่ 8: การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

อุณหภูมิ	%NaCl		ค่าพารามิเตอร์ ของสมการ Gompertz				RMSE
			A	B	C	M	
5	2	1	2.000	0.009	6.782	149.491	0.252
		2	2.000	0.009	6.836	146.845	0.216
		3	2.000	0.009	6.831	148.820	0.227
5	4	1	2.000	0.007	6.684	225.996	0.223
		2	2.000	0.007	6.697	224.891	0.240
		3	2.000	0.007	6.686	224.816	0.236
5	6	1	2.001	0.001	6.524	693.186	0.522
		2	2.004	0.001	6.719	721.946	0.492
		3	2.000	0.001	6.621	690.720	0.526
5	8	1	2.740	0.002	6.524	1148.571	0.406
		2	2.045	0.001	7.888	1075.801	0.466
		3	2.031	0.001	7.966	1059.942	0.434

Gompertz equation ; $L_t = A + C \exp \{-\exp[-B(t-M)]\}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9: การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

อุณหภูมิ	%NaCl		ค่าพารามิเตอร์ ของสมการ Gompertz				RMSE
			A	B	C	M	
10	2	1	2.000	0.018	5.711	64.929	0.268
		2	2.000	0.017	5.725	65.364	0.263
		3	2.000	0.018	5.731	65.616	0.248
10	4	1	2.000	0.012	6.067	78.863	0.421
		2	2.000	0.012	6.020	87.747	0.438
		3	2.000	0.011	6.035	85.957	0.445
10	6	1	2.000	0.004	6.664	308.522	0.400
		2	2.000	0.004	6.621	295.625	0.425
		3	2.000	0.004	6.701	319.593	0.439
10	8	1	2.000	0.001	6.921	785.264	0.392
		2	2.000	0.001	7.205	820.690	0.421
		3	2.000	0.001	6.766	775.224	0.434

Gompertz equation ; $L_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่10: การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

อุณหภูมิ	%NaCl		ค่าพารามิเตอร์ ของสมการ Gompertz				RMSE
			A	B	C	M	
15	2	1	2.000	0.037	6.586	31.948	0.301
		2	2.000	0.036	6.598	30.523	0.307
		3	2.000	0.034	6.582	30.029	0.313
15	4	1	2.000	0.030	6.804	38.352	0.239
		2	2.000	0.027	6.770	40.812	0.302
		3	2.000	0.028	6.807	40.024	0.250
15	6	1	2.000	0.020	6.772	59.002	0.416
		2	2.000	0.020	6.749	55.544	0.393
		3	2.000	0.021	6.772	54.422	0.426
15	8	1	2.000	0.005	6.463	150.000	0.397
		2	2.000	0.005	6.452	159.433	0.386
		3	2.000	0.005	6.441	153.496	0.435

Gompertz equation ; $L_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11: การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

อุณหภูมิ	%NaCl		ค่าพารามิเตอร์ ของสมการ Gompertz				RMSE
			A	B	C	M	
20	2	1	2.000	0.049	6.744	23.891	0.393
		2	2.000	0.049	6.734	23.701	0.445
		3	2.000	0.048	6.770	23.896	0.432
20	4	1	2.000	0.046	6.549	20.390	0.522
		2	2.000	0.042	6.640	22.462	0.551
		3	2.000	0.043	6.625	23.627	0.484
20	6	1	2.000	0.025	6.446	23.161	0.491
		2	2.000	0.033	6.451	25.577	0.585
		3	2.000	0.026	6.423	24.102	0.566
20	8	1	2.000	0.026	6.423	24.102	0.566
		2	2.000	0.024	6.061	38.046	0.455
		3	2.000	0.024	6.076	37.893	0.386

Gompertz equation ; $L_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

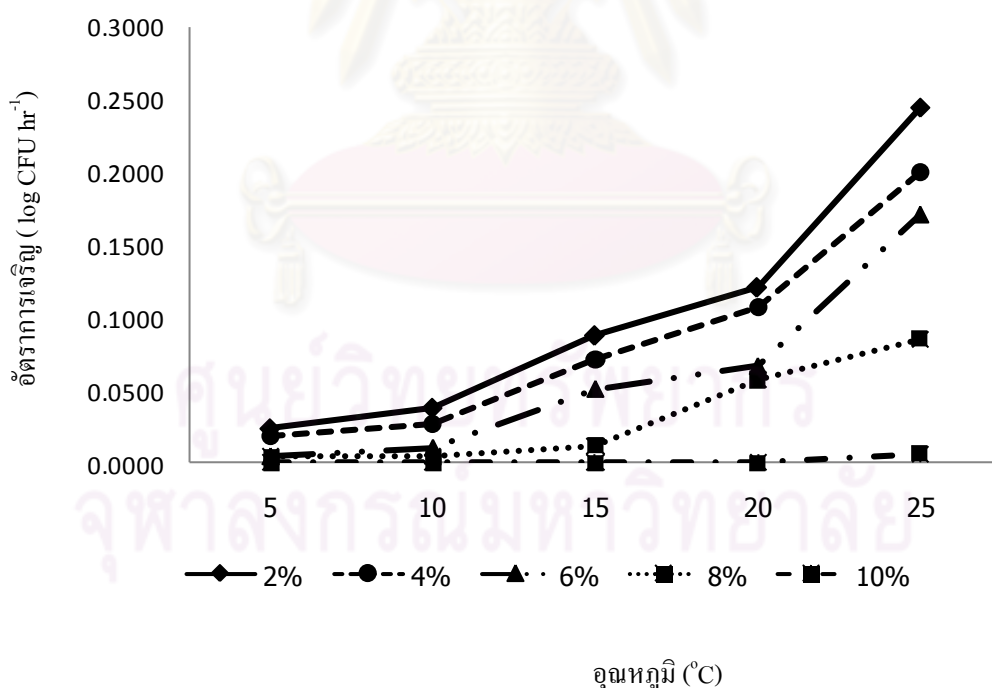
ตารางที่12: การวิเคราะห์ความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามสมการของ Gompertz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

อุณหภูมิ	%NaCl		ค่าพารามิเตอร์ ของสมการ Gompertz				RMSE
			A	B	C	M	
25	2	1	2.000	0.102	6.381	12.521	0.184
		2	2.000	0.103	6.336	12.521	0.217
		3	2.000	0.108	6.328	11.656	0.244
25	4	1	2.000	0.080	6.462	15.003	0.262
		2	2.000	0.090	6.487	14.729	0.277
		3	2.000	0.082	6.501	15.991	0.266
25	6	1	2.000	0.070	6.606	17.671	0.311
		2	2.000	0.070	6.617	17.730	0.337
		3	2.000	0.069	6.614	17.704	0.329
25	8	1	2.000	0.034	6.159	29.016	0.292
		2	2.000	0.037	6.202	29.210	0.255
		3	2.000	0.041	6.167	27.542	0.306

Gompertz equation ; $L_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการหาอัตราการเจริญ (growth rate : r) ของ *L.monocytogenes* ตามสมการของ Gompertz พบว่า ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมเดียวกัน *L.monocytogenes* มีแนวโน้มของอัตราการเจริญในเนื้อไก่ปรุงสุกเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ดังรูปที่ 9 จะเห็นว่าอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 2 ของน้ำหนักเนื้อไก่ ที่อุณหภูมิ 5,10,15,20 และ 25 จะเท่ากับ 0.023 , 0.037, 0.087, 0.121 และ 0.245 ตามลำดับ ซึ่งจะให้ผลลักษณะเดียวกันที่ร้อยละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 4 และ 6 ยกเว้นที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน คือ 0.005 และ 0.004 ตามลำดับ ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 10 จะพบอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในอัตราที่ต่ำมาก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.006 และสังเกตไม่พบการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิ 5, 10, 15 และ 20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 9: เปรียบเทียบ อัตราการเจริญ ($\log \text{CFU hr}^{-1}$) ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ของแต่ละคู่ปัจจัยของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์

ตารางที่ 13: อัตราการเจริญ (r) เฉลี่ย ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก โดยมีปัจจัยกระทบจากอุณหภูมิระหว่าง 5 – 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 - 10

%NaCl (w/w)	a_w	Growth rate (log CFU h ⁻¹) **				
		Temperature (°C)				
		5	10	15	20	25
2	0.979	0.0237±0.0006	0.0378±0.0008	0.0879±0.0032	0.1210±0.0012	0.2453±0.0071
4	0.968	0.0186±0.0003	0.0274±0.0021	0.0716±0.0033	0.1075±0.0048	0.2010±0.0121
6	0.950	0.0045±0.0001	0.0104±0.0001	0.0509±0.0013	0.0669±0.0102	0.1710±0.0010
8	0.947	0.0050±0.0007	0.0045±0.0001	0.0121±0.0002	0.0574±0.0044	0.0856±0.0084
10	0.921	NG	NG	NG	NG	0.0066±0.0015

NG ; no growth

** Gompertz equation $L_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$ ----- (1) EGR = BC/e ----- (2)

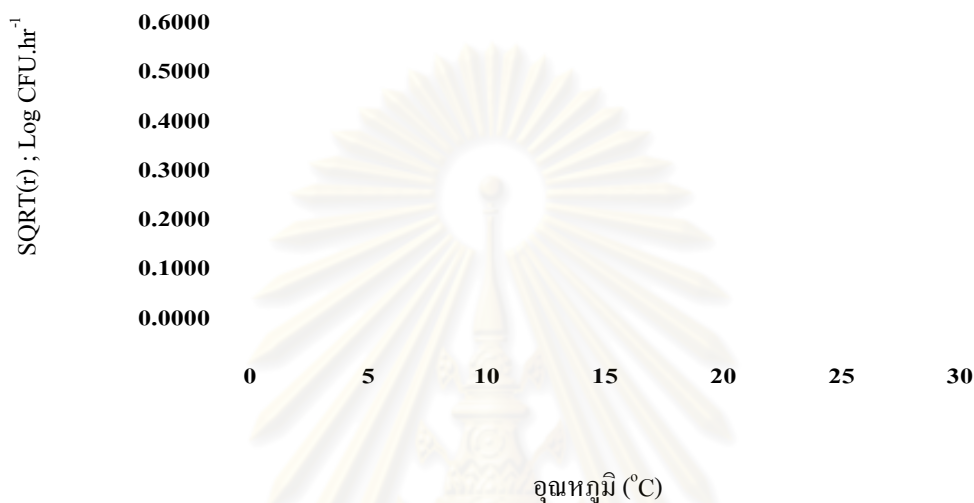
4.3 การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

ดำเนินการทวนสอบ ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญ ตามสมการ

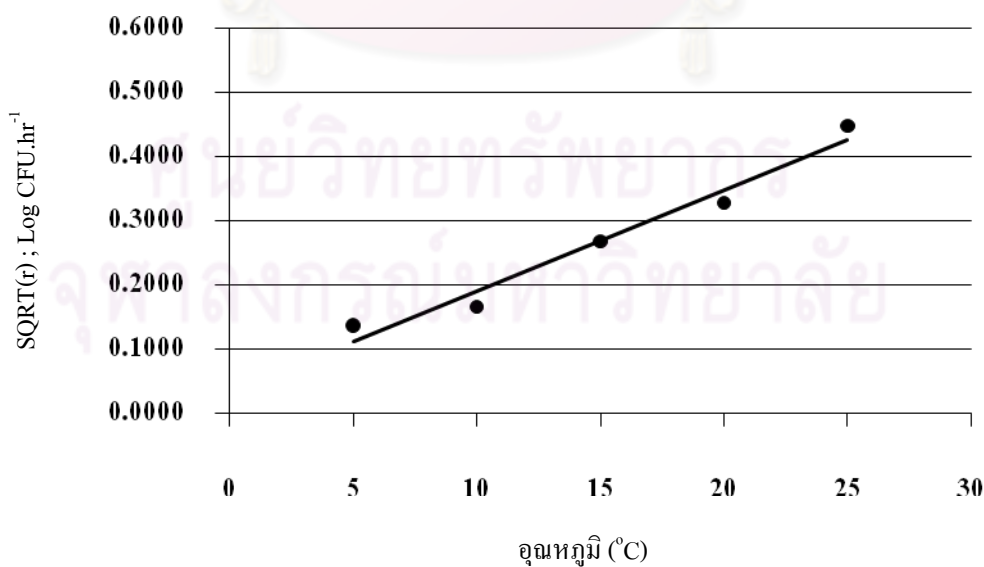
$$\sqrt{r} = b(T - T_{\min}) \text{ ----- (1)}$$

โดย r คือ อัตราการเจริญ (log CFU h⁻¹)
 b คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการ ถดถอย
 T คือ อุณหภูมิใดก็ได้ที่สนใจ หน่วยเป็น เคลวิน (K)
 T_{min} คือ อุณหภูมิต่ำสุดที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้

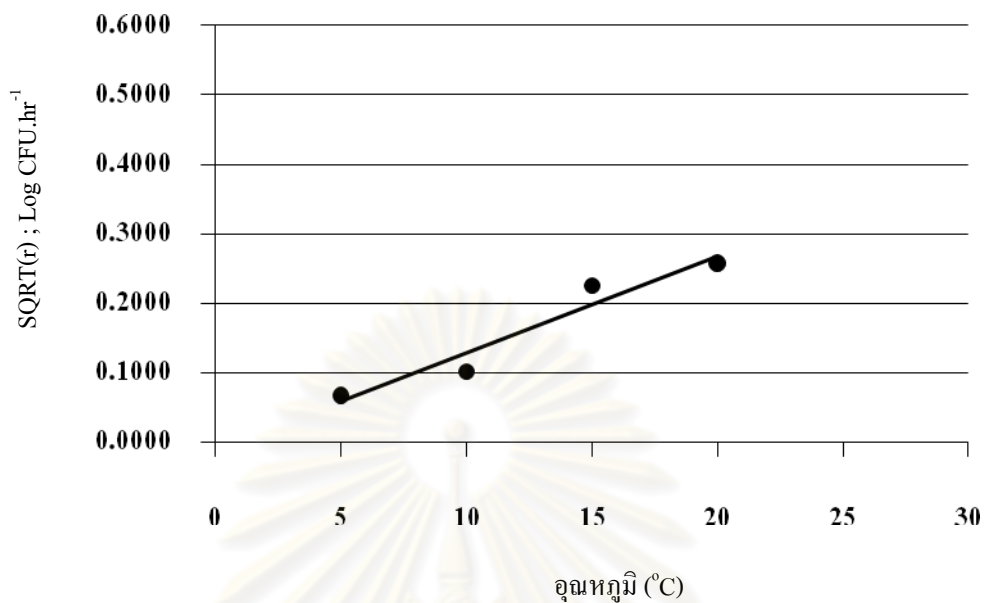
จากการทวนสอบบ่งชี้ว่าอุณหภูมิ กับอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงในทุกๆ ร้อยละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่า R square อยู่ระหว่าง 0.885 ถึง 0.967 ดังรูปที่ 10 ถึง 13



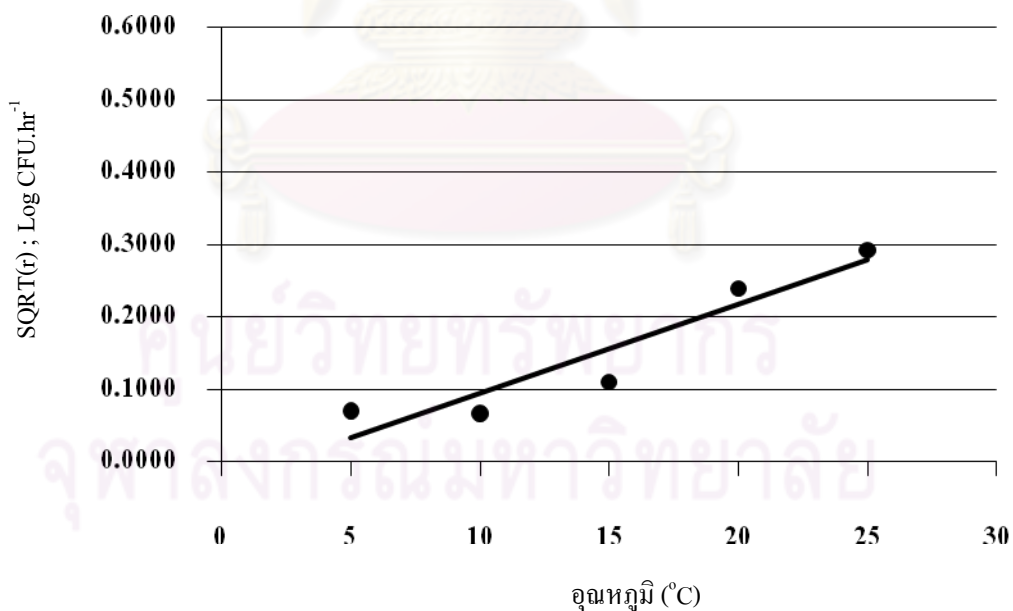
รูปที่ 10 : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และอัตราการเจริญ (\sqrt{r}) ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 2, R square เท่ากับ 0.959



รูปที่ 11 : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และอัตราการเจริญ (\sqrt{r}) ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 4, R square เท่ากับ 0.967



รูปที่ 12 : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และอัตราการเจริญ (\sqrt{r}) ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 6, R square เท่ากับ 0.937



รูปที่ 13 : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และอัตราการเจริญ (\sqrt{r}) ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุก ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 8, R square เท่ากับ 0.886

เมื่อวิเคราะห์ค่า RMSE ที่ได้จากการถดถอย มีค่าเท่ากับ 0.031 , 0.026 , 0.036 และ 0.040 ที่ร้อยละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 2 ,4 ,6, และ 8 ตามลำดับ รายละเอียดตามตารางที่ 14 จะเห็นว่า RMSE มีค่าน้อยมาก แสดงว่าสมการ ถดถอยที่ได้ในแต่ละชุดการทดสอบจากการทวนสอบแบบจำลอง $\sqrt{r} = b(T - T_{\min})$ มีความเหมาะสม สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ กับอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุกในแต่ละร้อยละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

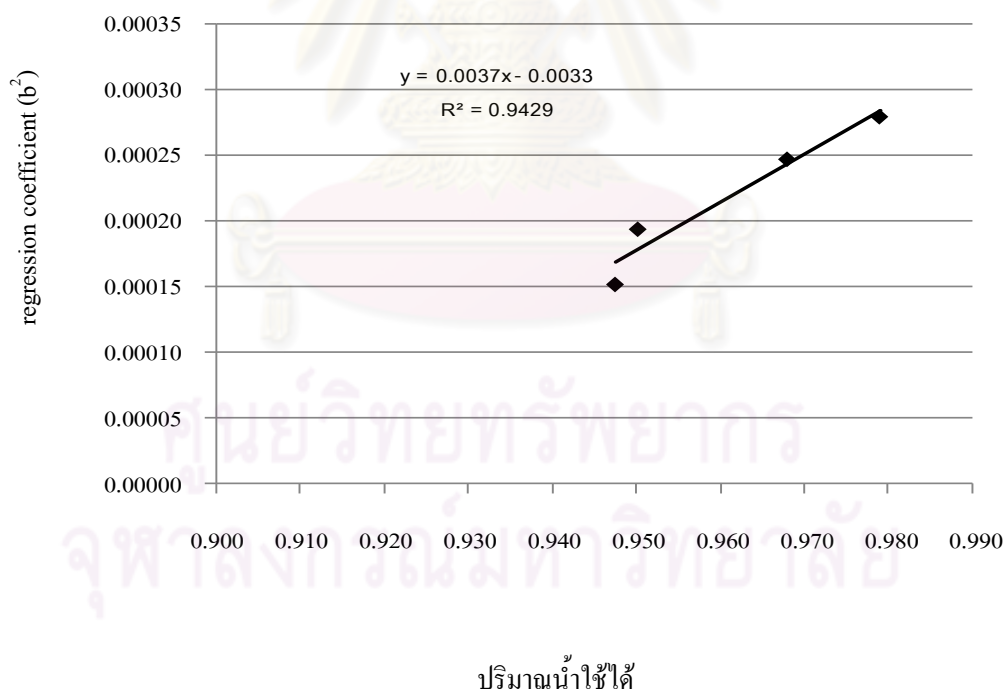
ตารางที่ 14: ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย (b) สมการความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ กับอัตราการเจริญ (\sqrt{r}) ของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุกในแต่ละร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

%NaCl	a_w	b value	T_{\min} (K)	RMSE	R^2	P value
2	0.979	0.017	270.4	0.032	0.959	0.003
4	0.968	0.016	271.0	0.026	0.967	0.002
6	0.950	0.014	272.8	0.036	0.937	0.032
8	0.947	0.012	275.5	0.041	0.886	0.017
10	0.922	NA	NA	NA	NA	NA

จากสมการที่ได้ สามารถ นำไปประมาณหาค่าอุณหภูมิต่ำสุด (T_{\min}) ของ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ในเนื้อไก่ปรุงสุก ที่มีช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ถึง 8 ของน้ำหนัก ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 272.4 องศาเซลเซียส

4.4 การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำใช้ได้ และ ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของ สมการที่ (1) ในรูป b^2

เมื่อดำเนินการทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (1) โดยสร้างเส้นโค้งความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ กับค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยในรูป b^2 ซึ่งแสดงตามรูปที่ 14 พบว่า ปริมาณน้ำใช้ได้ กับค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง จะเห็นได้จากค่า R square เท่ากับ 0.943 และเมื่อนำไปวิเคราะห์ค่า RMSE โดยสมการถดถอยได้เท่ากับ $1.6E05$ ซึ่งมิต้าน้อยมาก บ่งชี้ได้ว่าสมการมีความเหมาะสม สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้และค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (1) ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 14: แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และค่า b^2 จากสมการ $\sqrt{r} = b(T - T_{\min})$

จากเส้นโค้งความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำใช้ได้ และ ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (1) จะได้สมการความสัมพันธ์ คือ

$$b = \beta \sqrt{a_w} \quad \text{----- (2)}$$

โดยที่ b คือ สัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (1)

β คือ regression coefficient หรือ สัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (2)

จากสมการความสัมพันธ์ สามารถประเมินหาค่าปริมาณน้ำใช้ได้ต่ำสุด ($a_{w \min}$) ที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ในเนื้อไก่ปรุงสุก ในแต่ละร้อยละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 0.902 และค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของแบบจำลอง คือ 0.061

เมื่อแทนที่ b ในสมการที่ (1) ด้วย $\beta \sqrt{a_w}$ จากสมการที่ (2) จะได้สมการใหม่เป็น

$$\sqrt{r} = \beta \cdot \sqrt{a_w - a_{w \min}} \cdot (T - T_{\min}) \quad \text{----- (3)}$$

โดยที่ r = อัตราการเจริญ (Log CFU·hr⁻¹)

T = อุณหภูมิใดก็ได้ที่สนใจ ในหน่วยองศาเซลเซียส

T_{\min} = อุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้

a_w = ปริมาณน้ำใช้ได้ที่สนใจ

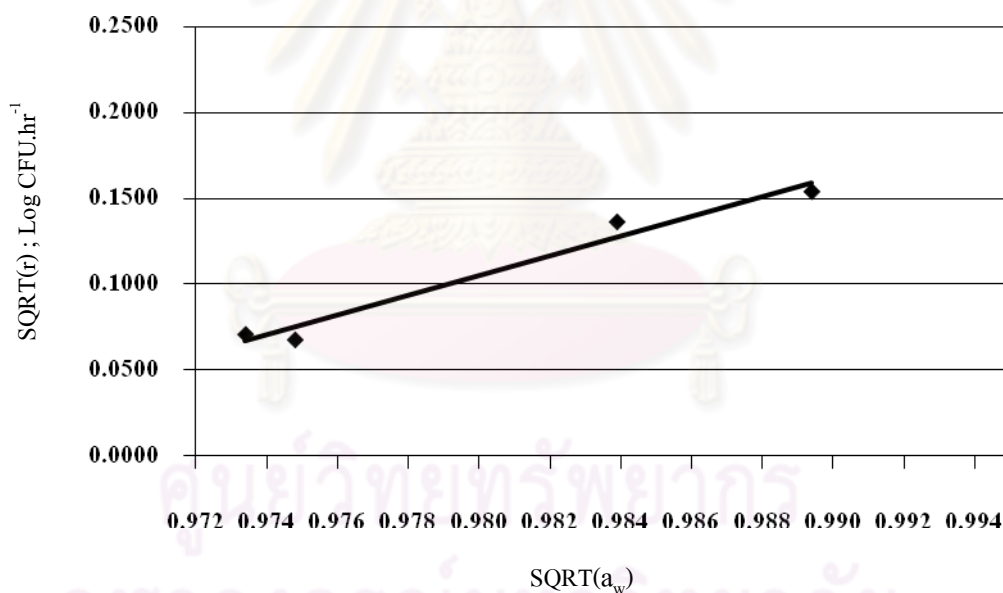
$a_{w \min}$ = ปริมาณน้ำต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้

จากที่ค่า b ในสมการที่ (1) ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการเส้นตรงระหว่างอัตราการเจริญ และอุณหภูมิ จะเปลี่ยนแปลงโดยมีผลมาจากค่าปริมาณน้ำใช้ได้ ขณะเดียวกันอัตราการเจริญ จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ร่วมกับปริมาณน้ำใช้ได้ จึงสามารถแทนที่ค่า b ในสมการที่ (1)

ด้วยปริมาณน้ำใช้ได้ที่สัมพันธ์กับค่า b นั้นๆ ดังนั้นถ้า b^2 ซึ่งเป็นสัดส่วน (proportion) กับค่า r มีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงกับปริมาณน้ำใช้ได้ หรือความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้น r ก็ย่อมมีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงกับปริมาณน้ำใช้ได้หรือความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ด้วย

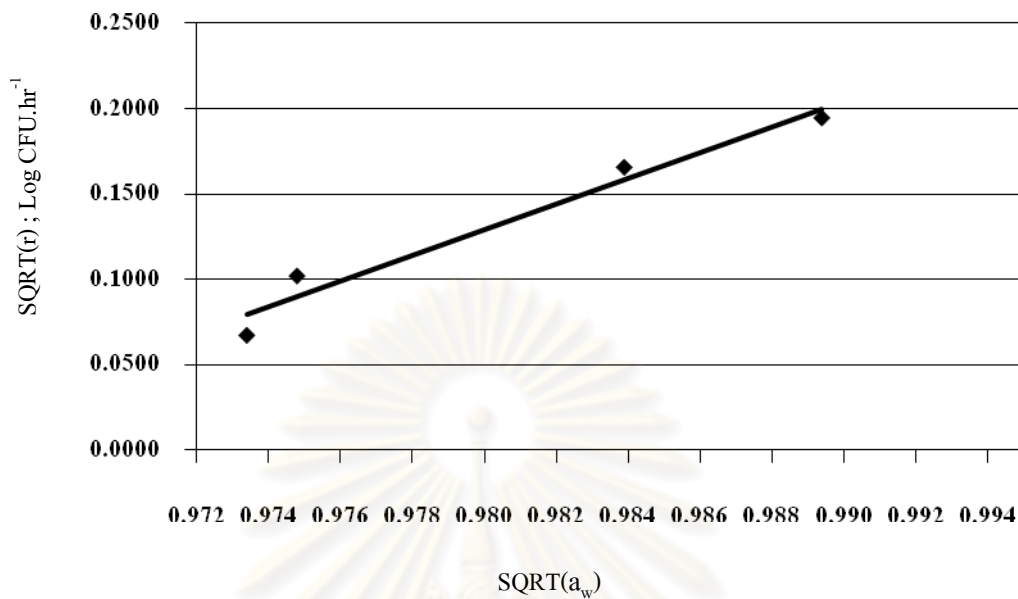
4.5 การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ และปริมาณน้ำใช้ได้

จากเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$ ในแต่ละอุณหภูมิ ตามรูปที่ 15 ถึง 19 เมื่อวิเคราะห์ความเหมาะสมในการใช้ สมการเส้นตรง (linear equation) โดยการประเมินค่า RMSE พบว่า ค่า RMSE ที่แสดงตามตาราง 4.4.1 ซึ่งมีค่าระหว่าง 0.009 ถึง 0.054 สามารถอธิบายได้ว่าระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$ มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง

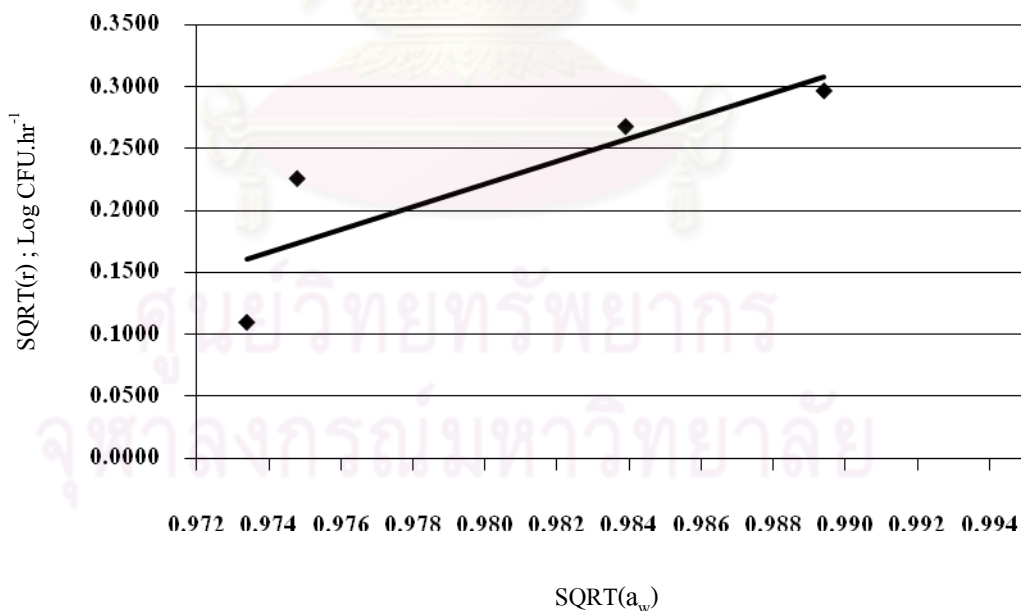


รูปที่ 15 : ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ *L.monocytogenes* และ $\sqrt{a_w}$ ที่

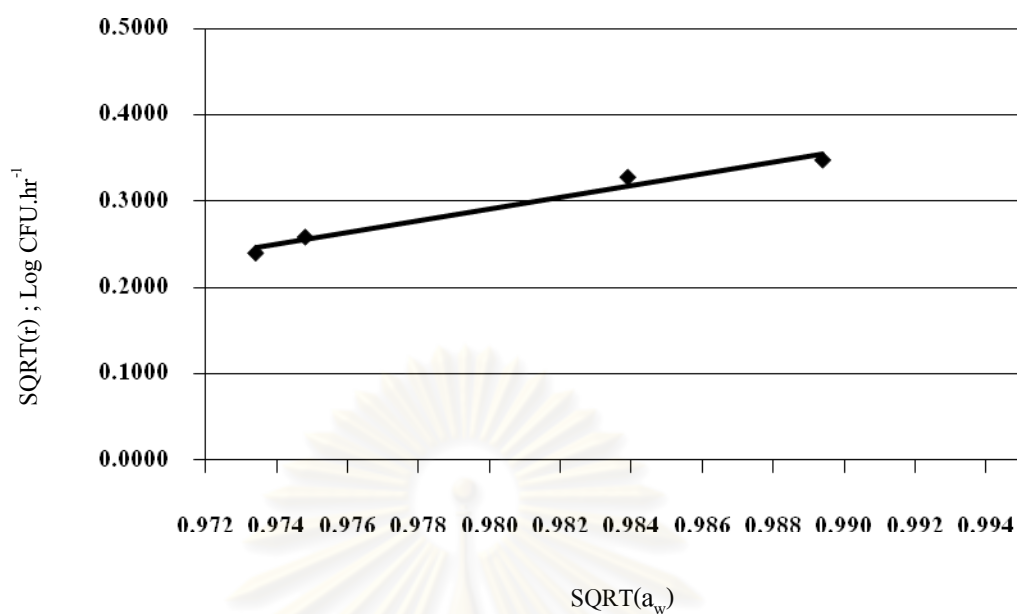
อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส, R square เท่ากับ 0.969



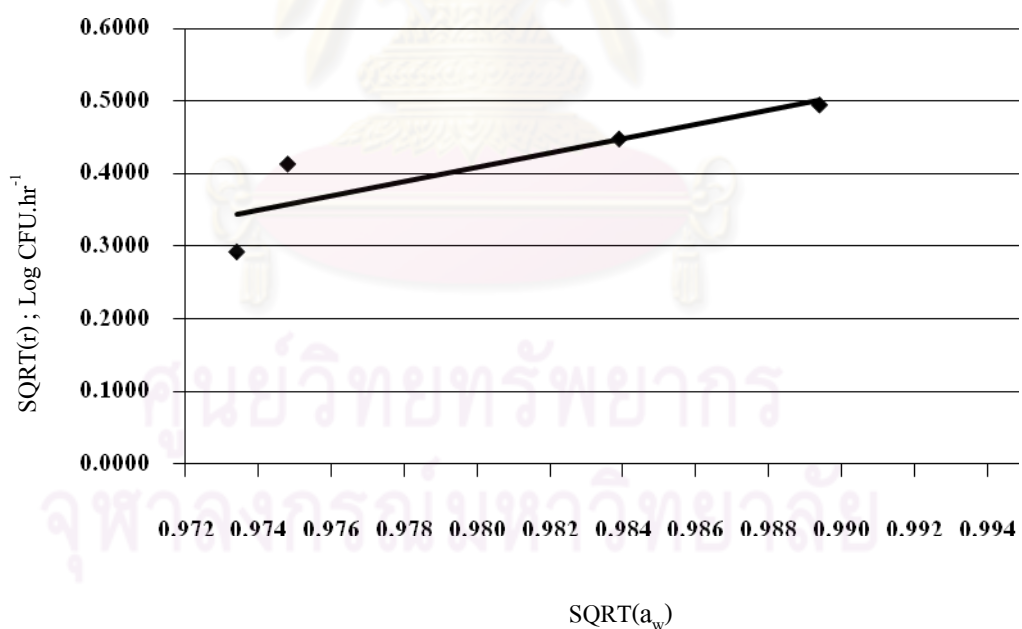
รูปที่ 16 : ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ *L.monocytogenes* และ $\sqrt{a_w}$ ที่ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส, R square เท่ากับ 0.962



รูปที่ 17 : ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ *L.monocytogenes* และ $\sqrt{a_w}$ ที่ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, R square เท่ากับ 0.724



รูปที่ 18 : ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ *L.monocytogenes* และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส, R square เท่ากับ 0.974



รูปที่ 19 : ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ \sqrt{r} ของ *L.monocytogenes* และ $\sqrt{a_w}$ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, R square เท่ากับ 0.741

ตารางที่ 15 : ค่า RMSE ของสมการความสัมพันธ์ระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$ ของ *L.monocytogenes* ในแต่ละอุณหภูมิ

อุณหภูมิ (°C)	RMSE	R ²	P value
5	0.009	0.969	0.015
10	0.013	0.962	0.019
15	0.052	0.724	0.149
20	0.010	0.974	0.012
25	0.054	0.741	0.139

เมื่อแทนค่าที่ประเมินได้จากข้อ 4.3 และ 4.4 จะได้แบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ที่มีปัจจัยกระทบเป็นอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ดังต่อไปนี้

$$\sqrt{r} = 0.061 \cdot \sqrt{a_w} - 0.902 \cdot (T - 272.4)$$

โดย r = อัตราการเจริญ (Log CFU·hr⁻¹)
 T = อุณหภูมิใดก็ได้ที่สนใจ ในหน่วยองศาเซลเซียส
 a_w = ปริมาณน้ำใช้ได้ที่สนใจ

4.6 การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

เบื้องต้นเมื่อ นำแบบจำลองคณิตศาสตร์ $\sqrt{r} = 0.061 \cdot \sqrt{a_w - 0.902} \cdot (T - 272.4)$ มาทดสอบการทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในช่วงอุณหภูมิ และปริมาณน้ำใช้ได้ที่ค่าต่างๆ รายละเอียดแสดงตามตารางที่ 16 จะสังเกตเห็นว่า เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลอง กับค่าที่ได้จาก การทำนายด้วยแบบจำลองคณิตศาสตร์ ในช่วงอุณหภูมิ 5-25 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2, 4, 6, และ 8 เท่ากับ 22.72 , 18.45 , 39.17 และ 136.24 ตามลำดับ แต่เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทวนสอบความใช้ได้ของแบบจำลองคณิตศาสตร์ ด้วยค่าทางสถิติ พบว่า มีค่า RMSE เท่ากับ 0.02 ค่า Bias factor เท่ากับ 0.93 และค่า Accuracy factor เท่ากับ 1.47 จากการวิเคราะห์ค่าดังกล่าว บ่งชี้ได้ว่า แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้จากการศึกษา สามารถนำไปใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุกได้

ตารางที่ 16: แสดงผลการทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ในแต่ละสภาวะ

$$\sqrt{r} = 0.061 \cdot \sqrt{a_w - 0.902} \cdot (T - 272.4)$$

%NaCl (a_w)	Temp. (°C)	Growth rate (cfu.h ⁻¹)		%diff
		Predicted*	observed	
2 (0.979)	25	0.192	0.245	21.537
	20	0.125	0.121	3.300
	15	0.072	0.088	18.039
	10	0.034	0.038	11.288
	5	0.010	0.024	59.460
4 (0.968)	25	0.165	0.201	17.698
	20	0.107	0.107	0.085
	15	0.062	0.072	13.626
	10	0.029	0.027	5.241
	5	0.008	0.019	55.579
6 (0.950)	25	0.121	0.171	29.027
	20	0.079	0.067	18.312
	15	0.045	0.051	10.819
	10	0.021	0.010	104.015
	5	0.006	0.005	33.676
8 (0.947)	25	0.115	0.085	34.291
	20	0.074	0.057	29.873
	15	0.043	0.012	256.206
	10	0.020	0.004	345.633
	5	0.006	0.005	15.211

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ ร่วมกับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อ อัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยสร้างเส้นโค้งการเจริญระหว่าง จำนวน *L.monocytogenes* ในรูปเลขยกกำลัง เทียบกับเวลา และวิเคราะห์ความเหมาะสมของ ข้อมูลการเจริญด้วยสมการของ Gompertz พบว่าทั้งอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่างมีผล ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* มีค่า RMSE ของแต่ละคู่ปัจจัย น้อยกว่า 0.5 บ่งชี้ว่า สมการของ Gompertz สามารถใช้อธิบายข้อมูลการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ที่มีปัจจัยกระทบเป็นอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Zwietering และคณะ (1990) ที่ได้เปรียบเทียบสมการสำหรับใช้อธิบายเส้นโค้งการ เจริญของ *Lactobacillus plantarum* โดยสมการของ Gompertz มีค่าพารามิเตอร์ที่พอเพียง สำหรับการอธิบายการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* มีค่าการยอมรับทางสถิติ วิเคราะห์ จากการทดสอบ t test , F test และค่า residual sum of squares (RSS) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดีกว่าสมการของ logistic, Exponential, Linear, Quadratic และ t th power เช่นเดียวกับใช้อธิบายเส้นโค้งการเจริญของ *Salmonella* Heidelberg, *Nocardia* sp. และ *L.monocytogenes* นอกจากนี้สมการ Gompertz ยังเป็นสมการที่ผู้วิจัยนิยมใช้อย่าง แพร่หลาย สำหรับการศึกษากการเจริญของแบคทีเรีย และการสร้างสมการสำหรับการทำนายการ เจริญ เนื่องจากเป็นสมการที่ไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยพารามิเตอร์ เพียง 3 ค่า (Gibson et al.,1987; Buchanan et al.,1993; Sutherland et al.,1994; Eifert et al.,1997; Murphy et al.,1996; Chorin et al.,1997; McElroy et al.,2000; Zhao et al.,2000; Lebert et al.,2000; Wijtzes et al.,2001; Riva et al.,2001; Membre et al.,1994; Devlieghere et al.,1999 และ Juneja et al.,1999)

ผลกระทบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* มีสาเหตุมาจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีคุณสมบัติสามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อผสมอยู่กับอาหารจะไปจับกับโมเลกุลของน้ำอิสระในอาหาร ทำให้ปริมาณน้ำใช้ได้ในการลด ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารที่มาจากเนื้อไก่จะมีการนำเกลือโซเดียมคลอไรด์ มาใช้สำหรับปรับปรุงคุณภาพของเนื้อไก่สด และใช้เป็นส่วนประกอบ (ingredient) ปรับปรุงรสชาติ ซึ่งเกลือโซเดียมคลอไรด์จะช่วยทำให้ลดการสูญเสียความชื้นของเนื้อไก่ ระหว่างการเก็บ และกระบวนการผลิตอาหาร เมื่อใช้ร่วมกับสารกลุ่มฟอสเฟต (Froning and Sackett, 1985 และ Lemos et al., 1999) สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่มีการรายงานไว้ว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ กับสารฟอสเฟต จะเสริมฤทธิ์กันมีผลต่อ water holding capacity ของเนื้อไก่ และช่วยเพิ่ม yield ของการผลิตอาหาร (Young and Lyon, 1986; Young et al., 1987 ; Woelfel and Sams, 2001)

แต่อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่เป็น suboptimal จากผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิ ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอก (extrinsic) จะมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* มากกว่าปริมาณน้ำใช้ได้ ซึ่งเป็นปัจจัยภายใน (intrinsic) ดังจะเห็นได้จากเมื่อนำอัตราการเจริญไปทดสอบความแตกต่างภายในกลุ่ม โดยการตรวจสอบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT (Duncan's New Multiple Rang Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 พบว่าอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เดียวกัน แต่อุณหภูมิต่างกัน จะมีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกันจะมีเพียงที่ร้อยละความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 2 และ 4 เท่านั้นที่มีอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมการเจริญของ *L.monocytogenes* ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ มีรายงานว่า *L.monocytogenes* สามารถมีชีวิตอยู่รอด (survival) และเจริญในสภาวะความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ค่อนข้างสูง โดย Hudson (1992) รายงานว่า *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ในอาหาร BHI ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 (w/v) โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 4 log CFU ภายใน 15 วัน และ 3 log CFU ภายใน 35 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

และ 2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสามารถทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ถึงความเข้มข้นร้อยละ 25 นานถึง 33 วัน

การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามสมการ $\sqrt{r} = b(T - T_{\min})$ จากการวิเคราะห์ค่า RMSE ของสมการถดถอย (linear regression) พบว่า อุณหภูมิ มีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงกับอัตราการเจริญในรูปเลขยกกำลัง ในทุกๆ ร้อยละ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) ค่า T_{\min} ของแต่ ร้อยละ ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะมีค่า T_{\min} ใกล้เคียงกัน เมื่อปริมาณน้ำใช้ได้ลดลง ซึ่งจะให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ McMeekin และคณะ (1987) ที่ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่อการเจริญของ *Staphylococcus xylosum* CM21/3 ผลกระทบของอุณหภูมิ ต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรีย สามารถอธิบายตามทฤษฎีความสัมพันธ์ (theoretical relationship) ของอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงอุณหภูมิระหว่างอุณหภูมิต่ำสุด (T_{\min}) และอุณหภูมิสูงสุด (T_{\max}) ที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ ซึ่งทั้ง T_{\min} และ T_{\max} จะได้มาจากการประมาณค่าที่เป็นไปได้ตามทฤษฎีในแต่ละชุดการทดลอง โดยอาจจะไม่สอดคล้องกับค่าการสังเกตจากการทดลอง ค่า T_{\min} และ T_{\max} เป็นค่าที่ใช้พิจารณาช่วงอุณหภูมิจำกัดของการเจริญ (Bajard et al.,1996, McMeekin et al.,1987, Ratkowsky et al.,1982) และเป็นไปได้ว่าการประมาณค่า T_{\min} อาจจะได้ไม่เท่ากันในแต่ละครั้งที่ศึกษา แม้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน เช่นเดียวกับที่ Walker และคณะ (1990) รายงานว่า *L.monocytogenes* เจริญใน chicken broth ได้ต่ำสุดที่อุณหภูมิ -0.4 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าค่าการประมาณของ Seeliger และ Jones (1986) นอกจากนี้ Michener และ Elliott (1964) เสนอแนะว่าค่าอุณหภูมิต่ำสุดที่เป็นค่าที่แท้จริง (true values) ที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ สามารถหาได้เพียงกรณีที่ถูกปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญ เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่านั้น (optimal conditions)

การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และค่าสมประสิทธิ์ถดถอย (b) ของสมการที่ (1) ในรูป b^2 สำหรับการสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์ สำหรับทำนายอัตราการเจริญ โดยมีอุณหภูมิ ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ เป็นปัจจัยกระทบ พบว่า ทั้งสองพารามิเตอร์มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างดี โดยมีค่า R square เท่ากับ 0.943 และค่า RMSE เท่ากับ 1.5E05 ดังนั้นถ้า b^2 ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากสมการที่ (1) และเป็นสัดส่วนของค่า \sqrt{r} มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำใช้ได้ ขณะเดียวกันค่า \sqrt{r} เป็นพารามิเตอร์ที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิร่วมกับปริมาณน้ำใช้ได้ ฉะนั้นจึงอนุมานได้ว่า \sqrt{r} กับปริมาณน้ำใช้ได้มีความสัมพันธ์กัน และจากการทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่าง \sqrt{r} และ $\sqrt{a_w}$ ในแต่ละอุณหภูมิโดยวิเคราะห์จากค่า R square และ RMSE สามารถสรุปได้ว่าที่อุณหภูมิ 5, 10 และ 20 องศาเซลเซียส ทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ที่อุณหภูมิ 15 และ 25 จะมีค่า RMSE ประมาณ 0.05 และค่า R square ประมาณ 0.72-0.74 แสดงว่าพารามิเตอร์ทั้งสองค่อนข้างมีความสัมพันธ์กัน

จากสมการความสัมพันธ์สามารถประมาณค่า T_{\min} จากสมการที่ (1) ได้เท่ากับ 272.4 องศาเซลวิน และ ค่า $a_{w\min}$ จากสมการที่ (2) ได้เท่ากับ 0.902 และค่าสัมประสิทธิ์ของสมการความสัมพันธ์ของสองปัจจัยกระทบ จากสมการที่ (3) ซึ่งเป็นค่าจำเพาะ ได้เท่ากับ 0.061 นำไปแทนค่าสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนาย คือ

$$\sqrt{r} = 0.061\sqrt{a_w - 0.902}(T - 272.4)$$

เมื่อนำแบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้จากงานวิจัย ไปทดสอบทำนายค่าอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก ในช่วงอุณหภูมิ 5-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ระหว่าง 0.979-0.947 และเปรียบเทียบความใช้ได้ของแบบจำลองกับค่าที่ได้จากการทดลอง พบว่า ค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองคณิตศาสตร์ มีความแตกต่างประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่อนข้างสูง แต่ยังคงอยู่ในขอบเขตการยอมรับ โดยค่า RMSE เท่ากับ 0.02 ค่า bias factor เท่ากับ 0.93 และค่า accuracy factor เท่ากับ 1.47

ถ้าพิจารณาค่าความแตกต่างของการทำนายในแต่ละคู่ปัจจัย จะเห็นว่า ค่าการทำนายที่เบี่ยงเบนสูงจะเป็นค่าการทำนายที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ในทุกความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ และถ้ามีปัจจัยความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับสูงๆ (ที่ร้อยละ 6 และ 8) ร่วมด้วย จะยิ่งมีผลทำให้ค่าการทำนายเบี่ยงเบนในเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้ไม่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ทำนายค่าการเจริญของ *L.monocytogenes* ในช่วงของอุณหภูมิและความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เป็นช่วงที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ingraham และคณะ (1983) ที่เสนอแนะว่าในช่วงสภาวะการเจริญที่เป็น extreme low rang ของ *L.monocytogenes* แบบจำลอง square root model อาจจะไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ทำนาย และ Bajard และคณะ (1996) บ่งชี้ว่าการเจริญของ *L.monocytogenes* ระหว่างช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ คือระหว่าง -2 ถึง 42 องศาเซลเซียส การเจริญในช่วงอุณหภูมิที่เป็น suboptimal จะไม่เป็นสมการเส้นตรง โดยจุดเปลี่ยนจะอยู่ที่จุดที่เรียกว่า T_c คือประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส ฉะนั้นถ้าการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญซ้อนทับกับจุด T_c จะทำให้ค่า T_{min} ของแบบจำลองไม่ถูกต้อง ซึ่งจะมีผลรวมไปถึงค่าการทำนายของแบบจำลองที่ได้ด้วย

การใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้จากงานวิจัย สำหรับการทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากเนื้อไก่ ต้องพิจารณาอย่างระมัดระวัง โดยผู้วิจัยนำเสนอทางเลือกสำหรับการนำไปใช้ทำนายสามารถแบ่งออกเป็น 3 กรณี

1. แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้จากการวิจัยสามารถใช้ทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยมีขอบเขตของอุณหภูมิระหว่าง 10-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้อยู่ในช่วงเท่ากับ 0.979-0.950 ซึ่งค่าความแตกต่างของการทำนายจะประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ค่า RMSE เท่ากับ 0.02 ค่า bias factor เท่ากับ 1.03 และค่า accuracy factor เท่ากับ 1.21 ตามตารางที่ 1 ในภาคผนวก ค
2. พิจารณาปรับใช้ค่า T_{min} และ a_{min} ในแบบจำลองคณิตศาสตร์การทำนาย แยกกันในแต่ละชุดการทดสอบ (individual) ตามตารางที่ 2 ในภาคผนวก ค โดยมีขอบเขตของอุณหภูมิระหว่าง 5-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้อยู่ในช่วงเท่ากับ 0.979-

0.947 ซึ่งค่าความแตกต่างของการทำนายจะประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ ค่า RMSE เท่ากับ 0.02 ค่า bias factor เท่ากับ 0.98 และค่า accuracy factor เท่ากับ 1.38

3. พิจารณาปรับใช้ค่า T_{\min} ในแบบจำลองคณิตศาสตร์การทำนาย แยกกันในแต่ละชุด การทดสอบ (individual) แต่ $a_{w\min}$ ค่าเดียวกัน ตามตารางที่ 3 ในภาคผนวก ค โดยมีขอบเขตของอุณหภูมิระหว่าง 5-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้อยู่ในช่วง เท่ากับ 0.979-0.947 ซึ่งค่าความแตกต่างของการทำนายจะประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ ค่า RMSE เท่ากับ 0.02 ค่า bias factor เท่ากับ 0.98 และค่า accuracy factor เท่ากับ 1.37

จะเห็นว่ากรณีที่ 2 และ 3 จะให้ผลการทำนายไม่แตกต่างกัน เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญ มากกว่าปริมาณน้ำใช้ได้

ดังนั้นจากผลการวิจัยในครั้งนี้ จะเห็นว่าแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ที่พัฒนาตามแบบจำลองของ McMeekin และคณะ (1987) สามารถนำไปใช้อธิบายการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายได้อย่างค่อนข้างถูกต้อง แม่นยำ และเป็นตัวแทนที่น่าเชื่อถือสามารถใช้ได้ในงานอุตสาหกรรมอาหารอื่น เนื่องจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งเชื่อว่าไม่มีความจำเพาะถึงระดับจีโนมไทป์ แต่ต้องใช้ในสถานการณ์ของสภาวะในขอบเขตที่ศึกษาวิจัยเท่านั้น ซึ่งถือได้ว่ามีประโยชน์เป็นอย่างมากสำหรับการประกันคุณภาพสินค้าอาหารที่ผลิตจากเนื้อไก่ในด้านความปลอดภัยของอาหารที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยจะเพิ่มความมั่นใจให้แก่ทั้งผู้ผลิต และผู้บริโภค และช่วยลดโอกาสการเจ็บป่วย หรือความเสี่ยงที่จะเกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วย *L.monocytogenes* ในห่วงโซ่อาหาร อีกทั้งสามารถใช้เป็นต้นแบบสำหรับการพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น หรือจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขชนิดอื่น โดยอาศัยข้อมูลการเจริญที่มีความน่าเชื่อถือ ซึ่งจะทำให้อุบัติการณ์การพบผู้ป่วยที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคติดต่อผ่านอาหารทั่วโลกลดลง อีกทั้งยังอาจช่วยลดการสูญเสียด้านเศรษฐกิจเนื่องจากต้องเรียกคืนสินค้า หรือทำลายผลิตภัณฑ์อาหารที่พบการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค

รายการอ้างอิง

- Adams, M.R., Little, C.L. and Easter, M.C. 1991. Modeling the effect of pH, acidulant and temperature on growth of *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol. 71: 65-71.
- Armitage, N.H. 1997. Use of predictive microbiology in meat hygiene regulatory activity. Int. J. Food Microbiol. 36: 103-109.
- Armstrong, D. 1995. *Listeria monocytogenes*. In: Principles and practice of infectious diseases, Bennett, G.L. and Dolin J.E.R. (eds.), New York: Churchill Livingstone. 1880.
- Augustin, J.C. and Carlier, V. 2000a. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 56: 29-51.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L. and Carlier, V. 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environm. Microbiol. 66(4): 1706-1710.
- Augustin, J.C., Carlier, V. and Rozier, J., 1998. Mathematical modeling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 84: 185-191.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C. and Caroli, D. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N. Engl. J. Med. 342(17). 1236-1241.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G. and Flandrois, J.P. 1996. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. Int. J. Food Microbiol. 29: 201-211.
- Banks, J.G. 1994. Process control and quality assurance through the application of HACCP and predictive microbiology. In: Minimal Processing of Foods and Process Optimization. An Interface. USA: CRC Press. 191-199.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23: 277-294.
- Bell, C. and Kyriakides, A. 2005. *Listeria*. In: A Practical Approach to The Organism and Its Control in Foods. Second edition. UK: Blackwell Publishing Limited.

- Bell, C. and Kyriakides, A. 2002. *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Pathogens-Hazards, Risk Analysis and Control, Blackburn, C.W., McClure, P. J. (eds.). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. 337-361.
- Bovill, R.A., Bew, J. and Baranyi, J. 2001. Measurement and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature II. Rapidly changing temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 131.
- Bovill, R.A., Bew, J., Cook, N., D'Agostino, M. Wilkinson, N. and Baranyi, J. 2000. Predictive of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 157.
- Brocklehurst, T.F., Mitchell, G.A. and Smith, A.C. 1997. A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiol.* 14: 303-311.
- Broughall, J.M. and Brown, C. 1984. Hazard analysis applies to microbial growth in foods: development and application of three-dimensional models to predict bacterial growth. *Food Microbiol.* 1: 13-22.
- Buchanan, R.L., Golden, M.H. and Phillips, J.G. 1997. Expanded models for the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 82: 567-577.
- Buchanan, R.L. and Whiting, R.C. 1996. Processed meats as a microbial environment. *Food Technol.* 40: 134-138.
- Buchanan, R.L., Bari, L.K., Goins, R.V. and Phillips, J.G. 1993. Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 10: 303-315.
- Buchanan, R.L. and Whiting, R.C. 1993. A classification of model in predictive microbiology. *Food Microbiol.* 10: 175-177.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A., 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monoctyogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 235-246.
- Buchanan, R.L. and Klawitter L.A. 1990. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *J. Food Sci.* 55 : 1754-1756.

- Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 53: 370-376.
- Busani, L., Cigliano, A., Taioli, E., Caligiuri, V., Chiavacci, L., Di Bella, C., Battisti, A., Duranti, A., Gianfranceschi, M., Nardella, M.C., Ricci, A., Rolesu, S., Tamba, M., Marabelli, R. and Caprioli, A. 2005. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* Contamination in Foods of Animal Origin in Italy. J. Food Prot. 68(8): 1729-1733.
- Carrasco, E., Garcia-Gimeno, R., Seselovsky, R., Valero, A., Pe'rez, F., Zurera, G. and Todd, E. 2006. Predictive model of *Listeria monocytogenes* 's growth rate under different temperature and acid. Food Sci. Tech. Int. 12(1): 47-56.
- Chasseingnaux, E., Gerault, P., Toquin, M.T., Salvat, G., Colin, P., and Ermel, G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS. Microbiol. Lett. 210: 271-275.
- Chhabra, A.T., Carter, W.H., Linton, R.H. and Cousin, M.A., 2002. A predictive model that evaluates the effects of growth conditions on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. J. Food Microbiol. 78: 235-243.
- Chhabra, A.T., Carter, W.H., Linton, R.H. and Cousin, M.A. 1999. A predictive model to determine the effects of pH, milk fat and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 62:1143-1149.
- Chorin, E., Thuault, D., Cleret, J.J. and Bourgeois, C.M. 1997. Modelling *Bacillus cereus* growth. Int. J. Food Microbiol. 38: 229.
- Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Kronkel, P., Pedrazzini, c., Beumer, R. and Siebenga, A. 1989. *Listeria spp.* in food processing and non food and domestic environments. Food Microbiol. 6: 49-62.
- Devlieghere, F., Van Belle, B. and Debevere, J. 1999. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. Int. J. Food Microbiol. 46: 57-70.

- Domann E., Wehland J., Rohde M., Pistor S., Hartl M., Goebel W., Leimeister-Wachter M., Wuenscher M. and Chakraborty T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11, 1981-1990.
- Donnelly, C.W. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: Guide to Foodborne Pathogens. Labbe, R.G. and Garcia, S. (eds.). New York: John Wiley & Sons. 99-132.
- Dramsi S., Bourdichon F., Cabanes D., Lecuit M., Fsihi H. and Cossart P. 2004. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Molec. Microbiol.* 53: 639-649.
- Dramsi S., Dehoux P., Lebrun M., Goossens P.L. and Cossart P. 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect. Immunol.* 65: 1615-1625.
- Duffy, G., Sheridan, J.J., Buchanan, R.L., McDowell, D.A. and Blair, I.S. 1994. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichment broths. *Food Microbiol.* 11: 429-438.
- Dykes, G.A. 2003. Behaviour of *Listeria monocytogenes* on two processed meat products as influenced by temperature or attached growth during preincubation. *Food Microbiol.* 20: 91-96.
- Eifert, J.D., Hackney, C.R., Pierson, M.D., Duncan, S.E. and Eigel, W.N. 1997. Acetic, lactic and hydrochloric acid effects on *Staphylococcus aureus* 196E growth based on a predictive model. *J. Food Sci.* 62: 174.
- Elliott, P.H. 1996. Predictive microbiology and HACCP. *J. Food Prot.* 59: 48-53.
- Esty, J.R. and Meyer, K.F. 1922. The heat resistance of the spore of *Bacillus botulinus* and all anaerobes. *J. Infect. Dis.* 31: 650-663.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 2000. *Listeria monocytogenes*. In: The Microbiology of Food, Lund, B.M., Baird-Parker, A.C. and Gould, G. (eds.), London: Chapman & Hall. 1178-1232.

- Farber, J.M. and Hartwig, J. 1996. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control*. 7: 253-258.
- Fernandez, A., Lopez, M., Bernardo, A., Condon, S. and Raso, J. 2007. Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solution of various water activities. *Food Microbiol*. 24: 372-379.
- Fernandez, P.S., George, S.M., Sills, C.C. and Peck, M.W. 1997. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*. 37: 37-45.
- Francois, K., Valero, A., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., Garcia-Gimeno, R.M., Zurere, G. and Devlieghere, F. 2007. Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, culture at refrigeration temperature. *Food Microbiol*. 24: 32-43.
- Froning, G.W. and Sackett, B. 1985. Effect of salt and phosphates during tumbling of turkey breast muscle on meat characteristics. *Poultry Sci*. 64: 1328-1333.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol*. 176: 269-275.
- Gaillot O., Pellegrini E., Bregenholt S., Nair S. and Berche P. 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molec. Microbiol*. 35: 1286-1294.
- Gaillard, S., Leguerinel, I. and Mafart, P. 1998. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Sci*. 63: 887-889.
- Gandhi, M. and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria* : A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol*. 113: 1-15.
- Gay, M., Cref, O. and Davey K.R. 1996. Significant of preincubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14 °C. *J. Appl. Bacteriol*. 81: 433-438.

- Gibson, A.M., Bratchell, N. and Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62: 497-490.
- Giovannacci, I., Ermel, G., Salvat, G., Vendeuvre, J.L. and Bellon-Fontaine, M.N. 2000. Physicochemical surface properties of live *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature J. Appl. Microbiol. 88: 92-100.
- Glass, K.A. and Doyle, M.P. 1989. *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environm. Microbiol. 55: 1565-1569.
- Gombas, D.E., Chen, Y. and Clavero, R.S. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. J. Food Prot. 66(4): 559-597.
- Gonzalez, F.D., Belina, D., Labuza, T.P. and Pal, A. 2007. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* based on time to detect model in culture media and frankfurters. Int. J. Food Microbiol. 113: 277-283.
- Gould, G. 1989. Predictive mathematical modeling of microbial growth and survival in food. Food Sci. Technol. 3(2) : 89-92.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. J. Food Prot. 53(9): 739-741.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B. 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equation describing the effects of temperature and pH. J. Food Prot. 56: 96-101.
- Herald, P.J. and Zottola, E.A. 1998. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperature and pH values. J. Food Sci. 53: 1549-1562.
- Homer, K.J. and Anagnostopoulos, G.D., 1975. Effect of water activity on heat survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. J. Appl. Bacteriol. 38: 9-17.
- Hudson J.A. 1992. Efficacy of high sodium chloride concentrations for destruction of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 14(4): 178-180.

- ICMSF. 1996. Microorganisms in foods 5. In: Microbiological Specifications For of Food Pathogens: *Listeria monocytogenes*, UK: Blackie Academic & Professional. 141-182.
- Ingraham, J. L., Maaloe, D. and Neidhardt, F.C. 1983. Growth of the bacterial cell, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 253.
- ISO 11290. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.
- Jackson, T.C., Hardin, M.D. and Acuff, G.R. 1997. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperature. J. Food Prot. 59: 230-237
- Jørgensen, F., Stephans, P.J. and Knøchel, S. 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 79: 274-281.
- Juneja, V.K. and Marks, H.M. 1999. Proteolytic *Clostridium botulinum* growth at 12-48 °C simulating the cooling of cooked meat: development of a predictive model. Food Microbiol. 16: 583.
- Kant-Muermans, M.L.T., Stekelenburg, F.K., Zwietering, M.H. and Huis in't Veld, J.H.J., 1997. Modeling the Shelf Life of Packed, Cooked Meat Products. In: World Congress on Food Hygiene, Hague, Netherlands. 53-57.
- Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J. Food Prot. 65(11): 1811-1829.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on solid surface. Food Microbiol. 21: 415-422.
- Lankford, C.E., Walker, J.R., Reeves, J.B., Nabbut, N.H., Byers, B.R. and Joues, R.J. 1966. Inoculum dependent division lag of *Bacillus* culture and its relation to a endogenous factor(s). J. Bacteriol. 91: 1070-1079.
- Lebert, L., Robles-Olvera, V. and Lebert, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed culture of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. Int. J. Food Microbiol. 61: 27.

- Lemos, A.L.S.C., Nunes, D.R.M and Viana, A.G. 1999. Optimization of the still-marinating process of chicken parts. *Meat Sci.* 52: 227-234.
- Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D. and Hackney, C.R., 1995. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 58: 946-954.
- Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., Hackney, C.R. and Eifert, J.D., 1996. Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant milk. *J. Food Prot.* 59:16-23.
- Lund, B.M. 2000. Freezing. In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol.1, Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. (eds.). USA. 122-145.
- Marquis H., Doshi V. and Portnoy D.A. 1995. The broad range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect.Immunol.* 63: 4531-4534.
- McClure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P. and Roberts, T.A. 1997. Predictive modeling of growth of *Listeria monocytogenes*, The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 221-232.
- McElroy, D.M., Jaykus, L.A. and Foegeding, P.M. 2000. Validation and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice, *J. Food Prot.* 63: 268.
- McMahon, C.M.M., Doherty, A.M., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. and Hegarty, T., 1999. Synergistic effect of heat and sodium lactate on the thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in minced beef. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:340-344.
- McMeekin, T.A., Ross, T., and Olley, J. 1992. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 15: 13-32.

- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S. and Ratkowsky, D.A. 1987. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. J. Appl. Bacteriol. 62: 543-550.
- McMeekin, T.A. and Olley, J. 1986. Predictive Microbiology. Food Technol. 38(8): 331-334.
- McKellar, R.C. and Lu, X. 2003. Secondary model. In: Modeling Microbial Responses in Food. United States of America: CRC press. 63-97.
- McKellar, R.C. 1997. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. Int. J. Food Microbiol. 36: 179-186.
- McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J. and Jewell K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int. J. Food Microbiol. 92: 15-33.
- McLanchlin, J. 1993. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Environmental Policy and Practice. 3(3): 201-214.
- Meldrum, R.J., Brocklehurst, T.F., Wilson, D.R. and Wilson, P.D.G., 2003. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10 °C. Food Microbiol. 20: 97-103.
- Mellefont, L.A. and Ross, T. 2003. The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. Int. J. Food Microbiol. 83: 295-305.
- Membre, J.M., Amezquita, A., Bassett, J., Giavedoni, P., Blackburn, C.W and Gorris, L.G.M. 2006. A probabilistic modeling approach in thermal inactivation: estimation of postprocess bacillus ceceus spore prevalence and concentration. J. Food. Prot. 69:118-129.
- Membre. J.M., Ross, T. and McMeekin, T. 1999. Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. Lett. Appl. Microbiol. 28: 26-30.
- Membre, J.M. and Tholozan, J.L. 1994. Modeling growth and off-flavours production of spoiled beer bacteria, *Pectinatus frisingensis*. J. Appl. Microbiol. 77: 456.

- Michener, H.D and Elliott, R.P. 1964. Minimum growth temperature for food poisoning, fecal indicator and psychophillic microorganisms. *Adv Food Res.* 13: 349-396.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. and McMeekin, T.A. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 133-142.
- Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B. and Baird, R.M. 1995. Essentials of The Microbiology of Food. In: A Textbook for Advanced Studies. New York, USA: John Wiley & Sons Ltd,
- Muller, H.E. 1990. Listeria isolations from feces of patients with diarrhea and from healthy food handlers. *Infection.* 18(2): 97-100.
- Murphy, R.Y., Osaili, T., Duncan, L.K. and Marcy, J.A., 2004. Effect of sodium lactate on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ground chicken thigh and leg meat. *J. Food Prot.* 67: 1403-1407.
- Murphy, P.M., Rea, M.C. and Harrington, D. 1996. Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in range of dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 557-564.
- Neumeyer, K., Ross, T. and McMeekin, T.A. 1997a. Development of model describing the effects of temperature and water activity on growth of spoilage *Pseudomonas*. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 45-54.
- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G. and McMeekin, T.A. 1997b. Validation of model describing the effects of temperature and water activity on growth of psychrotropic *Pseudomonas*. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 55-63.
- Nyati, H. 2000. Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modeling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 123-132.
- Parry, R.T. 1993. Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food. London: Blackie academic and professional. 1-17.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. and Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial culture. *J. Bacteriol.* 149: 1-5.

- Riva, M., Franzetti, L. and Galli, A. 2001. Microbiological quality and shelf life modeling of ready to eat cicorino. *J. Food Prot.* 64: 228.
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C. and Tompkin, R.B. 1996. Microorganisms in Food 5. In: Microbiological Specification of Food Pathogens ICMFS. London: Blackie academic and professional. 141-182.
- Roberts, T.A. 1989. Combinations of antimicrobials and processing methods. *Food Technol.* 43: 156-163.
- Rosso, L., Lobry, J.R. and Flandrois, J.P. 1993. An unexpected relationship between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 162: 447-463.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8 °C: consequences for the shelf life of chill products. *J. Food Prot.* 59: 944-949.
- Ross, T. and McMeekin, T.A. 1994. Principles and potential of predictive microbiology – application of a square root model for *Staphylococcus aureus* growth in seafood products. *Food Aust.* 43 : 202-207.
- Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt J., Binkin N. and Salmaso S. 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.* 117: 429-436.
- Scott, W.J. 1936. The growth of microorganisms on ox muscle: The influence of water content of substrate on rate of growth at -1 °C . *J. Counc. Sci. Ind. Res. (Aust)*.9: 177-182.
- Schubert W.D., Urbanke C., Ziehm T., Beier V., Machner M.P., Domann E., Wehland J., Chakraborty T. and Heinz D.W. 2002. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell.* 111: 825-836.
- Seeliger, H.P.R. and K. Hohes, 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: *Methods in Microbiology.* 13: 31-49.

- Seeliger, H.P.R. and Jones, D. 1986. Genus *Listeria* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (editors), The Williams and Wilkins Co.1235-1245.
- Shabala, L., Lee, S.H., Cannesson, P. and Ross, T. 2008. Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *J. Food. Prot.* 71(6): 1169-1177.
- Sibelius, U., Schulz E.C., Rose F., Hattar K., Jacobs T., Weiss S., Chakraborty T., Seeger W. and Grimminger F. 1999. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listerolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect. Immunol.* 67: 1125-1130.
- Skandamis, P., Tsigarida, E. and Nychas G.J.E., 2000. Ecophysiological attributes of *Salmonella* Typhimurium in liquid culture and within gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 31-35.
- Stechini, M.L., Torre, D.M., Sarais, I., Saro, O., Messina, M. and Maltine, E., 1998 Influence of structural properties and kinetic constraints on *Bacillus cereus* growth, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1075-1078.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M. and Humphrey, T.J. 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery time of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* 83: 445-455.
- Sutherland, J.P. and Bayliss, A.J. 1994. Predictive modeling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 217.
- te Giffel, M.C and Zwietering, M.H. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 135-149.
- Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Gaze, J.E., Kondjayan, A., Boyd, A.R., Shaw, H.L. and Van Impe, J.F. 2006. Quantitative description of *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics with temperature and water activity as the influencing

- factors; model prediction and methodological validation on dynamic data. *J. Food Eng.* 76: 79-88.
- Vankerschaver, K., Wilcox, F., Smout, C., Hendrickx, M. and Tobback, P. 1996. The influence of temperature and gas mixtures on the growth of the intrinsic microorganisms on cut endive: predictive versus actual growth. *Food Microbiol.* 13: 427-440.
- Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. 1985. Meat and meat products. In: *Technology, Chemistry and Microbiology*. UK: Chapman and Hall. 98-386.
- Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperature. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 157-162.
- Walker, S.L., Brocklehurst, T.F. and Wimpenny, J.W.T., 1997. The effects of growth dynamics upon pH gradient formation within and around subsurface colonies of *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Microbiol.* 82: 610-614.
- Walls, I. and Scott, V.N. 1997a. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 1142-1145.
- Walls, I. and Scott, V.N. 1997b. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 36: 97-102.
- Wei, Q.K. and Fang, T.J. 2001. Validation of growth models for *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in cooked chicken meat. *J. Food Drug Anal.* 9(3): 153-159.
- Whiting, R.C. and Bagi, L.K. 2000. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. In: *Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings*, Van Impe, J.F.M., Bernaerts, K. (Eds.), Belgium: KULeuven/BioTeC. 147-156 (ISBN 90-804818-3-1).
- Whiting, R.C. and Bagi, L.K. 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 73: 294-295.
- Wijtzes, T., Rombouts, F.M., Kant-Muermans, M.L.T., van't Riet, K. and Zwietering, M.H. 2001. Development and validation of combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*. *Int. J. Food Microbiol.* 63: 57.

- Willox, F., Mercier, M., Hendrickx, M. and Tobback, P. 1993. Modelling the influence of temperature and carbon dioxide upon the growth of *Pseudomonas fluorescens*. Food Microbiol. 10: 159.
- Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T. and Van Impe, J.F. 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. Int. J. Food Microbiol. 73: 275-289.
- Woelfel, R.L. and Sams, A.R. 2001. Marination performance of pale broiler breast meat. Poultry Sci. 80: 1519-1522.
- Yoon, K.S., Burnette, C.N. and Whiting, R.C. 2003. Effects of pH and agitation on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A on Brain Heart Infusion broth containing combined potassium lactate and sodium diacetate during storage at 4 or 10C. J. Food. Prot. 66: 1469-1473.
- Young, L.L. and Lyon, B.G. 1986. Effect of sodium tripolyphosphate in the presence and absence of calcium chloride and sodium chloride on water retention properties of chicken breast meat. Poultry Sci. 65: 898-902.
- Young, L.L., Lyon, C.E., Search, G.K. and Wilson, R.L. 1987. Influence of sodium tripolyphosphate and sodium chloride on moisture-retention and textural characteristics of chicken breast meat patties. J. Food Sci. 52: 571-574.
- Zhao, L., Montville, T.J and Schaffner, D.W. 2000. Inoculum size of *Clostridium botulinum* 56A spores influences time to detection and percent growth positive samples. J. Food Sci. 65: 1365.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Riet, K. T. 1990. Modeling of bacterial growth curve. Appl. Environm. Microbiol. 56(6): 1875-1881.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. UVM broth : Selective primary enrichment medium

(1A) Base Medium^①

Proteose Peptone	5.0	g.
Tryptone	5.0	g.
Lab-Lamco'Powder	5.0	g.
Yeast extract	5.0	g.
Sodium chloride	20.0	g.
Di-sodium hydrogen phosphate	12.0	g.
Potassium dihydrogen phosphate	1.35	g.
Aesculin	1.0	g.
Water	1000	ml.

(1B) Listeria Primary Selective Enrichment Supplement (UVMI) SR0142B

Nalidaxic acid	45.0	mg.
Acriflavin	27.0	mg.
Sterile distilled water	10.0	ml.

อัตราส่วนการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(1A)Base Medium	2250	ml.
(1B) SR0142B	10.0	ml.

2. Fraser Broth : Selective secondary enrichment medium

(2A) Base Medium¹

Meat peptone	5.0	g.
Tryptone	5.0	g.
Meat extract	5.0	g.
Yeast extract	5.0	g.
Sodium chloride	20.0	g.
Disodium hydrogen phosphate dehydrate	12.0	g.
Potassium dihydrogen phosphate	1.35	g.
Aesculin	1.0	g.
Lithium chloride	3.0	g.
Sodium salt of nalidixic acid	0.02	g.
Water	1,000	ml.

(2B) Acriflavine hydrochloride solution²

Acriflavine hydrochloride	0.25	g.
Water	100	ml.

(2C) Ammonium iron(III) citrate solution²

Ammonium iron(III) citrate	5.0	g.
Water	100	ml.

อัตราส่วนการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(2A) Base Medium	10	ml.
(2B) Acriflavine hydrochloride solution	0.1	ml.
(2C) Ammonium iron(III) citrate solution	0.1	ml.

3. ALOA agar : First selective plating-out medium

(3A) Base medium¹

Enzymatic digest of animal tissues	18.0	g.
------------------------------------	------	----

Enzymatic digest of casein	6.0	g.
Yeast extract	10.0	g.
Sodium pyruvate	2.0	g.
Glucose	2.0	g.
Magnesium glycerophosphate	1.0	g.
Magnesium sulfate (anhydrous)	0.5	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Lithium chloride	10.0	g.
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	2.5	g.
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside	0.05	g.
Agar	12 – 18	g.
Water	930	ml.
 (3B) Nalidixic acid solution		
Nalidixic acid sodium salt	0.02	g.
Sodium hydroxide (0.05 mol/l)	5	ml.
 (3C) Ceftazidime solution		
Ceftazidime	0.02	g.
Water	5	ml.
 (3D) Polymixin B solution		
Polymixin B sulfate	76 700	IU
Water	5	ml.
 (3E) Antibiotic supplement		
Cycloheximide solution		
Cyclohexamide	0.05	g.
HCl (1 mol/l)	2.5	ml.
Dimethylformamide (DMF)	7.5	ml.

Amphotericin B

Amphotericin B	0.01	g.
HCl (1 mol/l)	2.5	ml.
Dimethylformamide (DMF)	7.5	ml.

(3F) Supplement

L- α -phosphatidylinsital (Sigma P6636 ^{®3})	2.0	g.
Cold water	50	ml.

อัตราส่วนการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(3A) Base medium	930	ml.
(3B) Nalidixic acid solution	5.0	ml.
(3C) Ceftazidime solution	5.0	ml.
(3D) Polymixin B solution	5.0	ml.
(3E) Cycloheximide solution	5.0	ml.
Or Amphotericin B solution	10.0	ml.
(3F) Supplement	50.0	ml.

4. Oxford agar : Second selective plating-out medium

(4A) Agar base¹

Proteose peptone	23.0	g.
Starch	1.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Aesculin	1.0	g.
Lithium chloride	15.0	g.
Ammonium iron(III) citrate	0.5	g.
Agar	9-18	g.
Water	1,000	ml.

(4B) Supplement for 1,000 ml. Medium²

Cycloheximide	400	mg.
Colistin sulfate	20	mg.
Acriflavine hydrochloride	5.0	mg.
Cefotetan	2.0	mg.
Fosfomycin	10	mg.
Ethanol	5.0	ml.
Water	5.0	ml.

5. Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA) : Solid culture medium¹

Tryptone	17.0	g.
Soya peptone	3.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Dipotassium phosphate	2.5	g.
Glucose	2.5	g.
Yeast extract	6.0	g.
Agar	9-18	g.
Water	1,000	ml.

6. Sleep blood agar

(6A) Base medium¹

Meat peptone	15	g.
Liver digest	2.5	g.
Yeast extract	5.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Agar	9-18	g.
Water	1,000	ml.
Defibrinate sheep blood	50-70	ml.

7. Carbohydrate utilization broth Rhamnose broth

(7A) Base medium¹

Proteose peptone	1.0	g.
Meat extract	1.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Bromocresol purple	0.02	g.
Water	1,000	ml.

(7B) Rhamnose solution²

Rhamnose	5.0	g.
Water	100	ml.

(7C) Xylose solution²

Xylose	5.0	g.
Water	100	ml.

อัตราส่วนการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(7A) Base medium	9.0	ml.
(7B) หรือ (7C)	1.0	ml.

8. Motility agar¹

Casein peptone	20.0	g.
Meat peptone	6.1	g.
Agar	3.5	g.
Water	1,000	ml.

9. CAMP medium

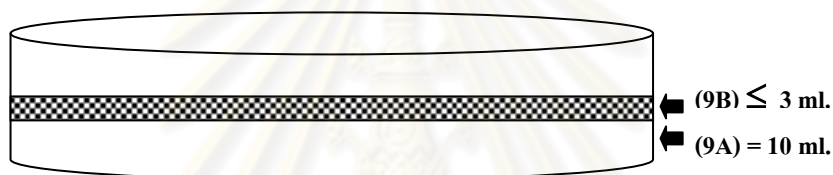
(9A) Base medium¹

Meat peptone	15	g.
Liver digest	2.5	g.

Yeast extract	5.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Agar	9-18	g.
Water	1,000	ml.

(9B) Sheep blood medium ตามข้อ (6)

เทอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ (9A) ใส่เพลทๆละ 10 ml. ทิ้งไว้ให้แข็งตัวในอุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีแล้วเททับด้วย (9B) โดยปริมาตรไม่เกิน 3 ml. ต่อเพลท หากมีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (9A) ไว้ล่วงหน้าให้นำออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 20 นาที ก่อนแล้วจึงเททับด้วย (9B)



รูปที่ 20: การเทเพลท CAMP test medium

หมายเหตุ

- ❶ Dissolve the components in water. Sterilize for 15 min in the autoclave set at 121°C
- ❷ Sterilize by filtration

*** After sterilization is pH 7.2 ± 0.2 at 25°C

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

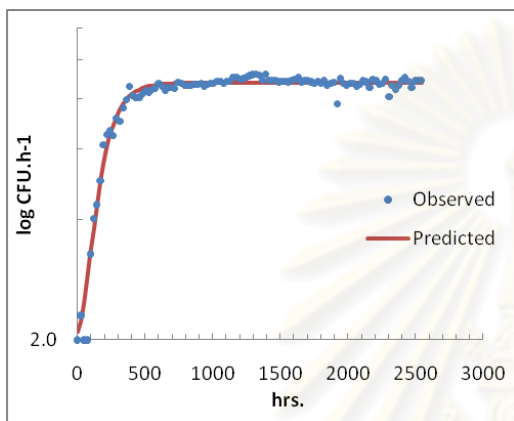
1. ข้อมูลค่าความสัมพันธ์ค่าปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity) ในเนื้อไก่ปรุงสุก ของแต่ละร้อยละ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

%NaCl (w/w)	ค่าปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity, a_w)*				
	2	4	6	8	10
1	0.9800	0.9660	0.9440	0.9510	0.9270
2	0.9760	0.9740	0.9560	0.9310	0.9200
3	0.9750	0.9630	0.9440	0.9340	0.8950
4	0.9820	0.9680	0.9540	0.9580	0.9240
5	0.9800	0.9590	0.9340	0.9530	0.9230
6	0.9820	0.9760	0.9510	0.9430	0.9060
7	0.9810	0.9720	0.9470	0.9490	0.9100
8	0.9780	0.9670	0.9510	0.9400	0.9410
9	0.9800	0.9620	0.9610	0.9590	0.9350
10	0.9760	0.9730	0.9600	0.9570	0.9350
ค่าเฉลี่ย	0.9790	0.9680	0.9502	0.9475	0.9216

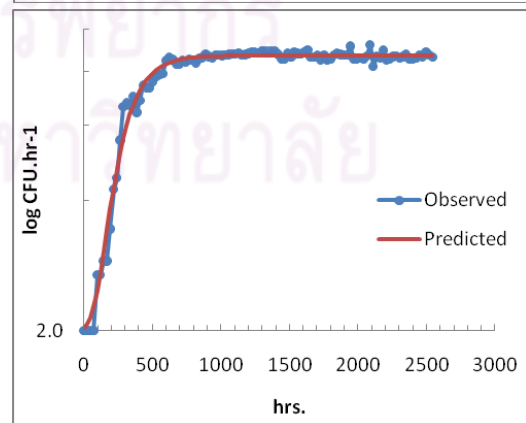
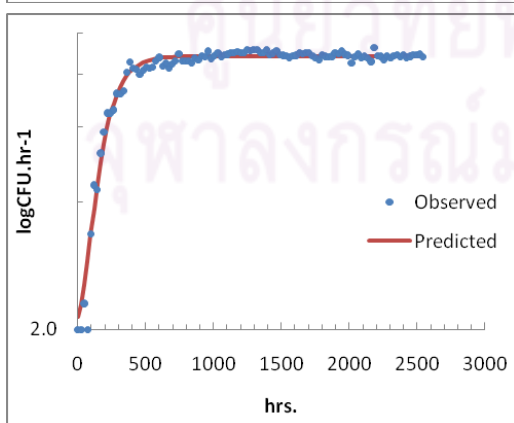
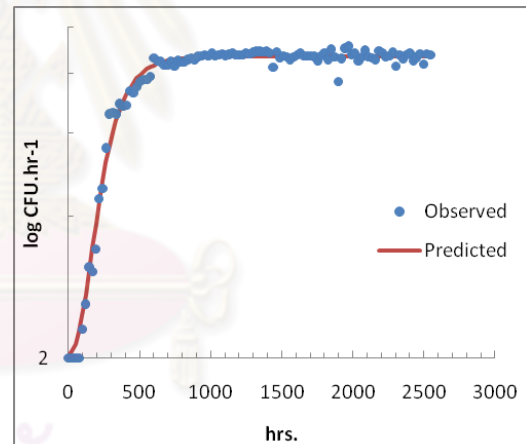
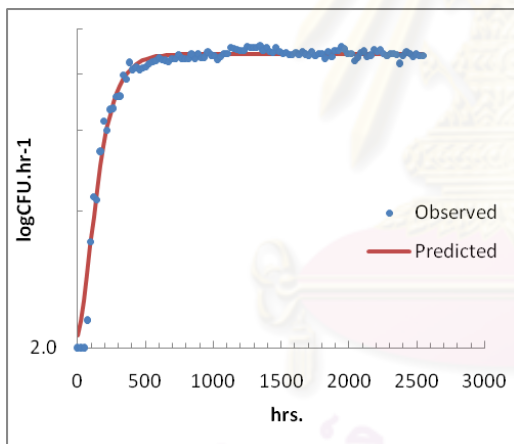
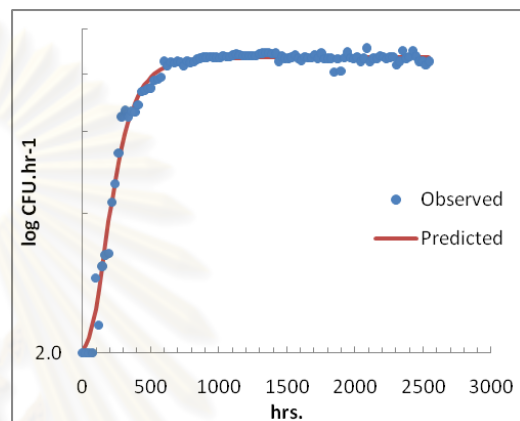
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เส้นโค้งการเจริญของ *L.monocytogenes* แต่ละคู่ปัจจัย ที่ทดสอบความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญตามสมการของ Gompertz
- 2.1 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

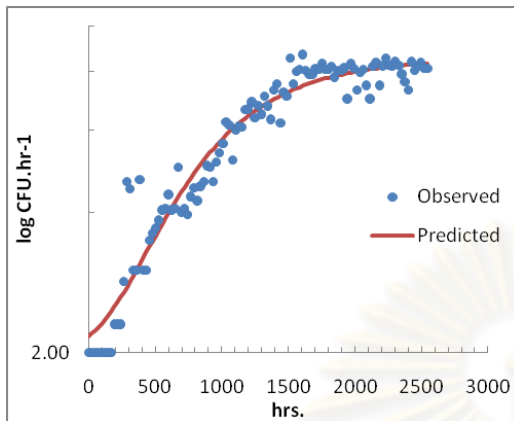
(1) 2%NaCl



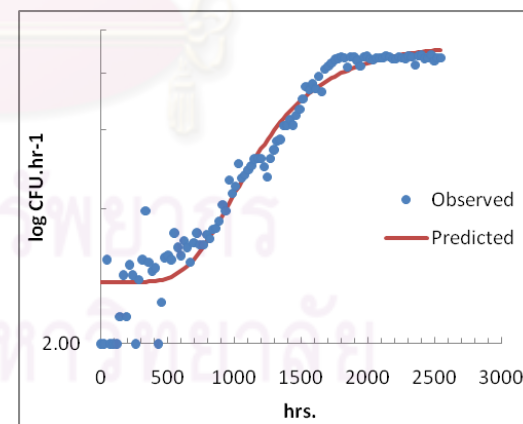
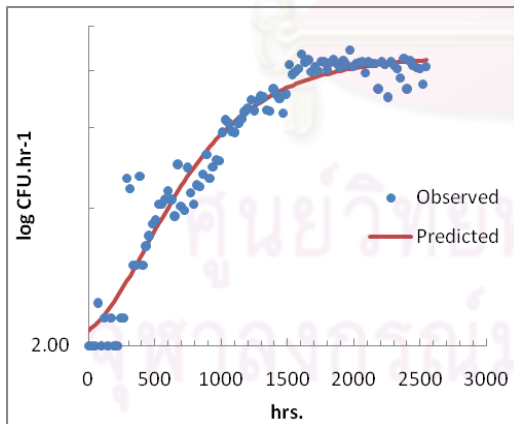
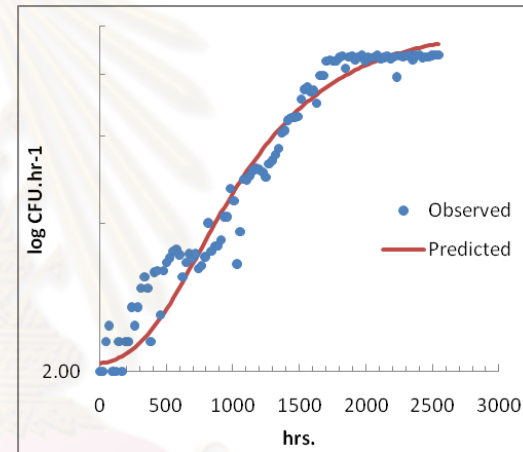
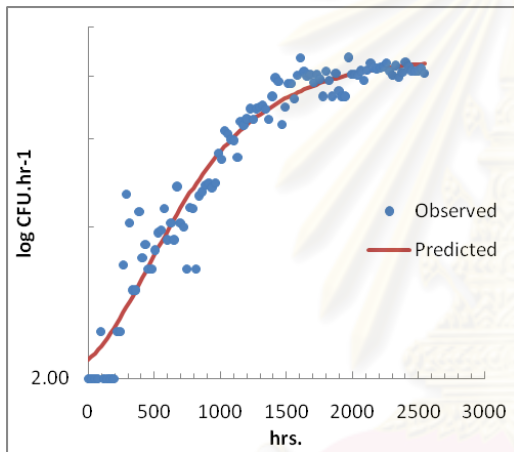
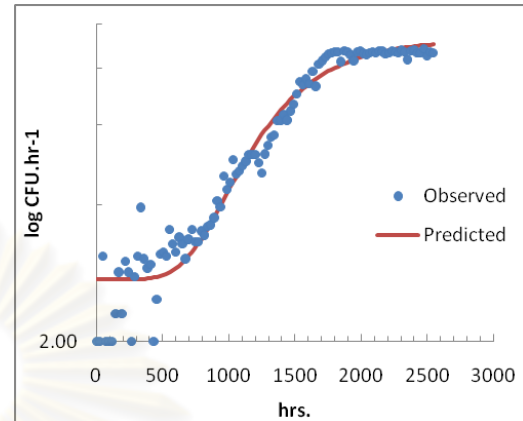
(2) 4%NaCl



(3) 6%NaCl

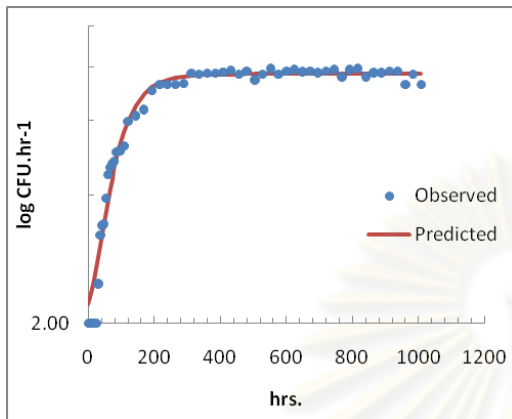


(4) 8%NaCl

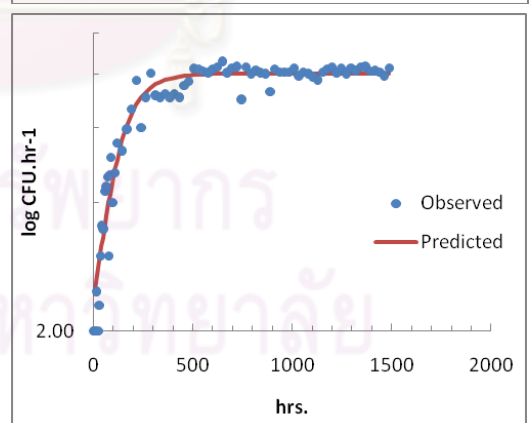
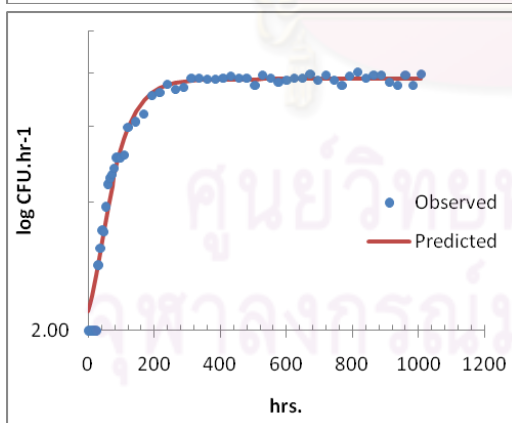
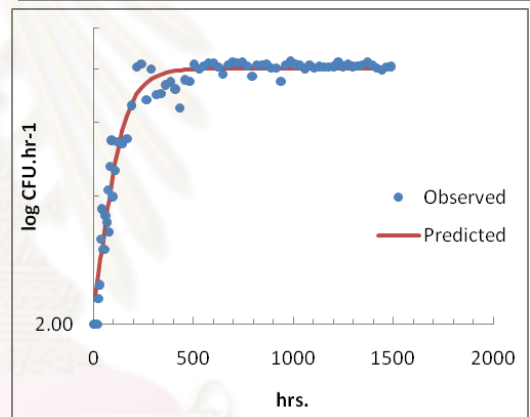
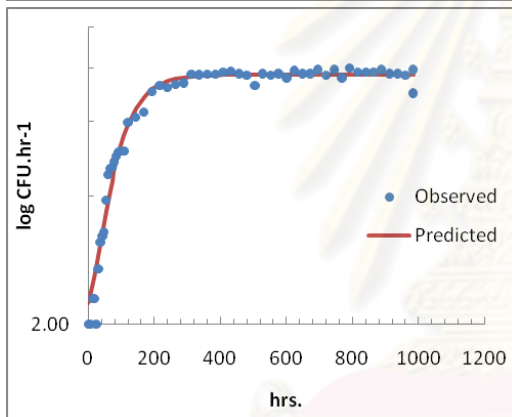
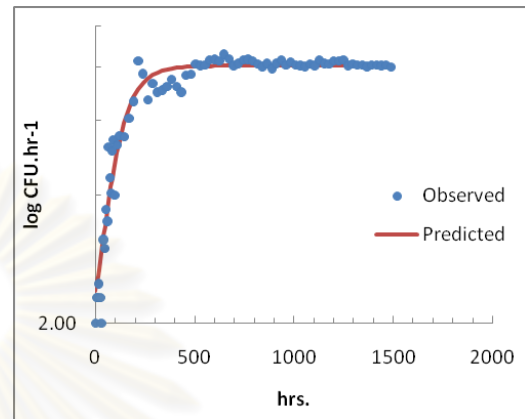


2.2 ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

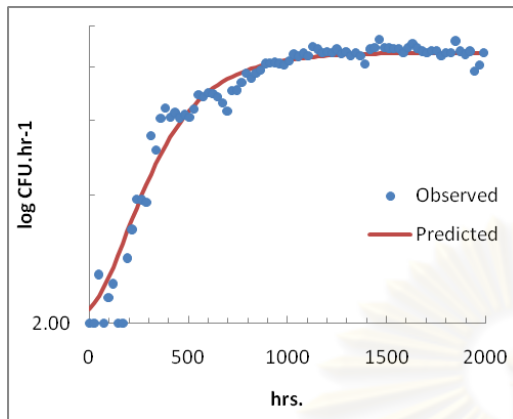
(1) 2%NaCl



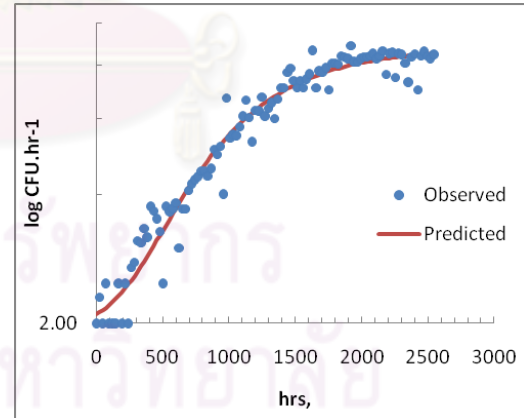
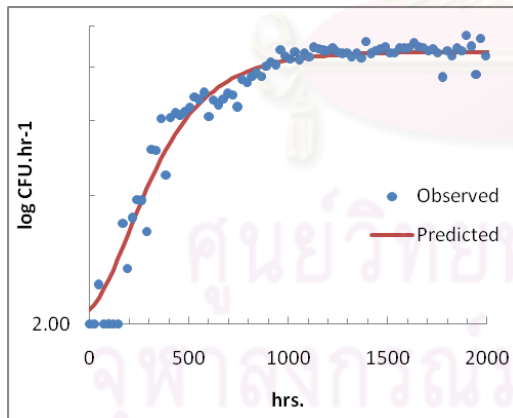
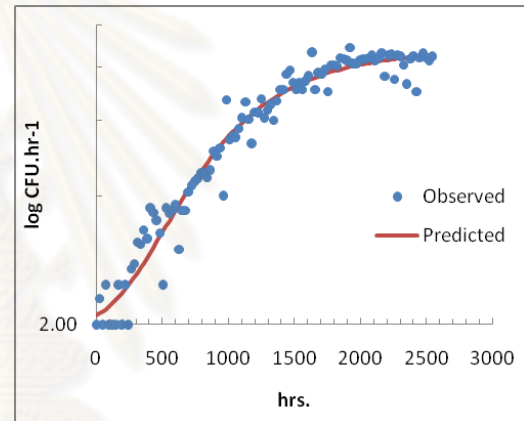
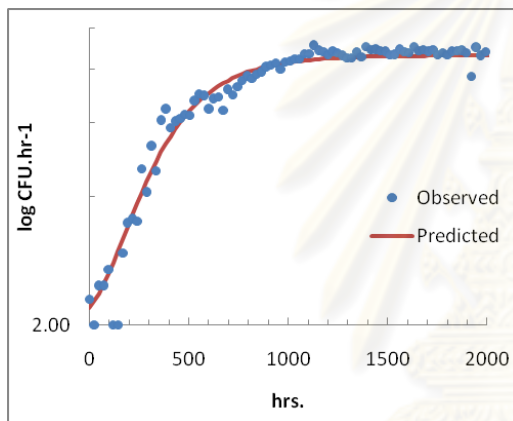
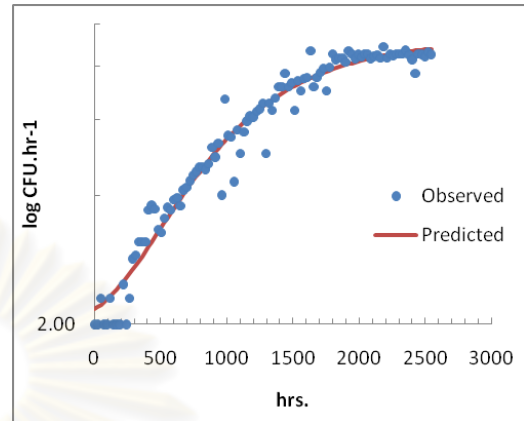
(2) 4%NaCl



(3) 6%NaCl

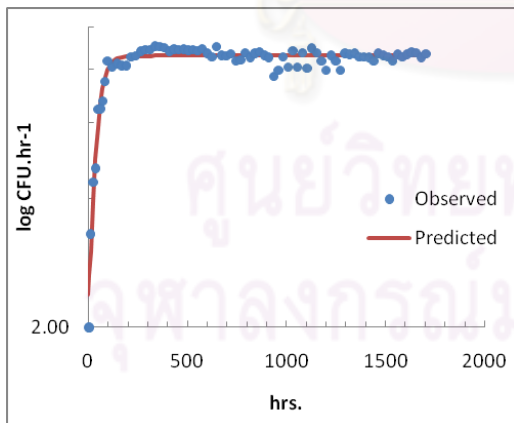
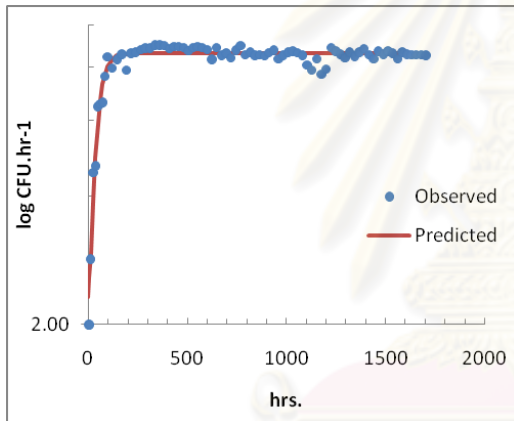
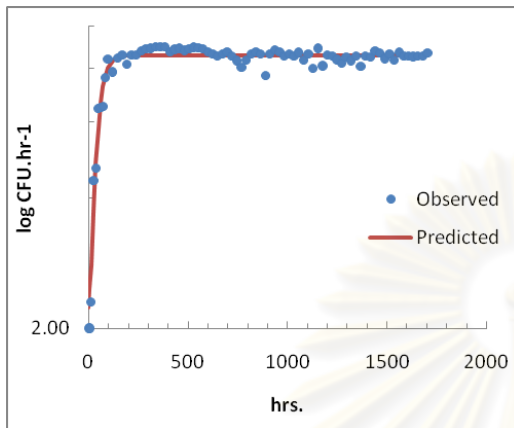


(4) 8%NaCl

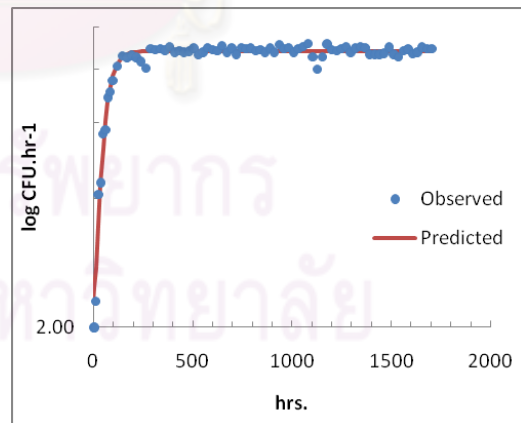
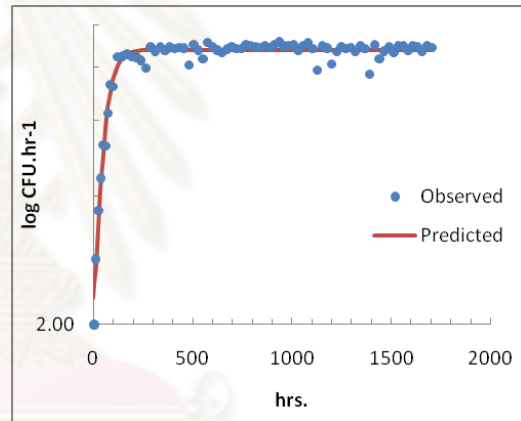
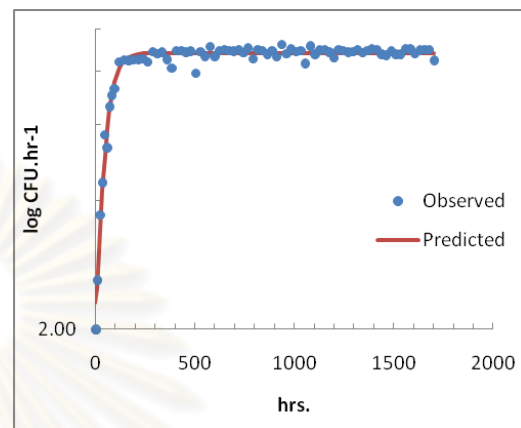


2.3 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

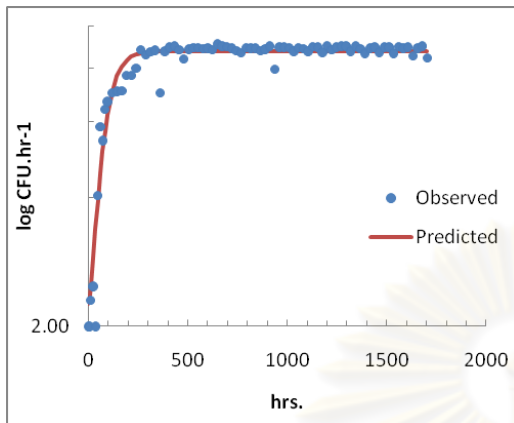
(1) 2%NaCl



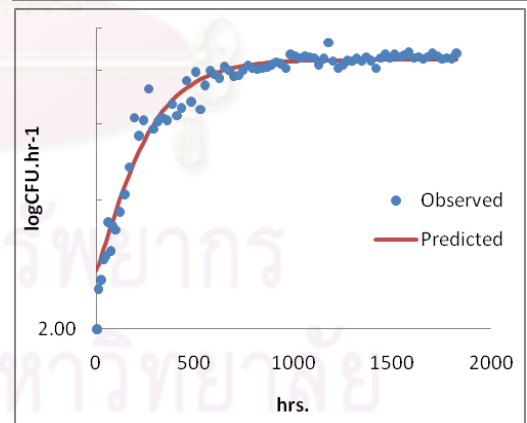
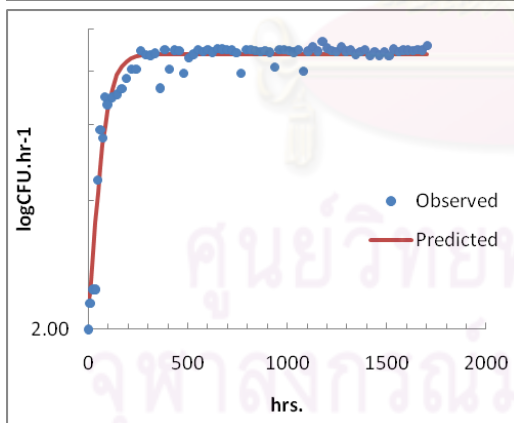
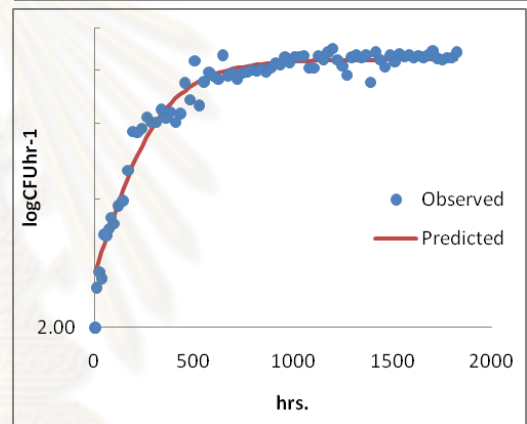
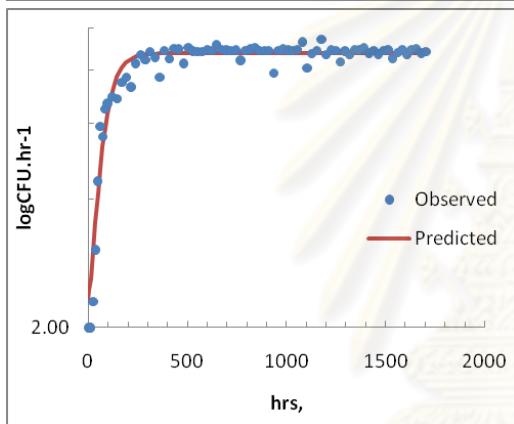
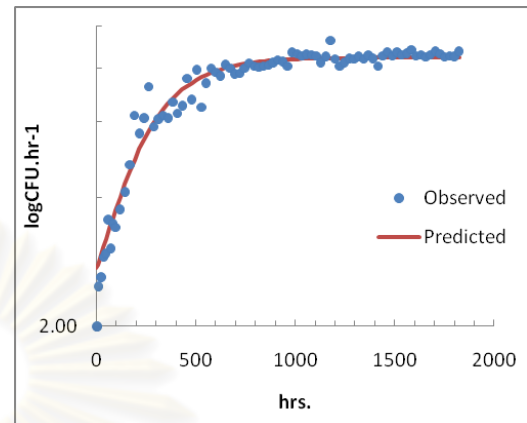
(2) 4%NaCl



(3) 6%NaCl

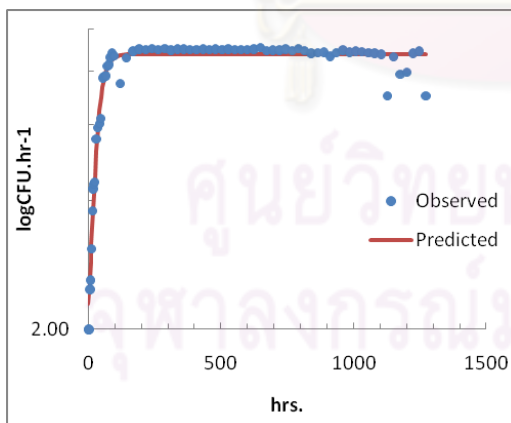
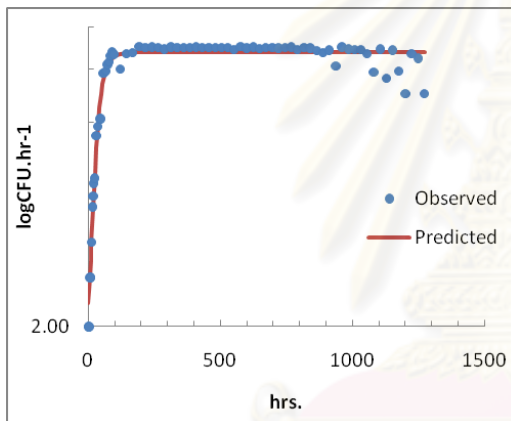
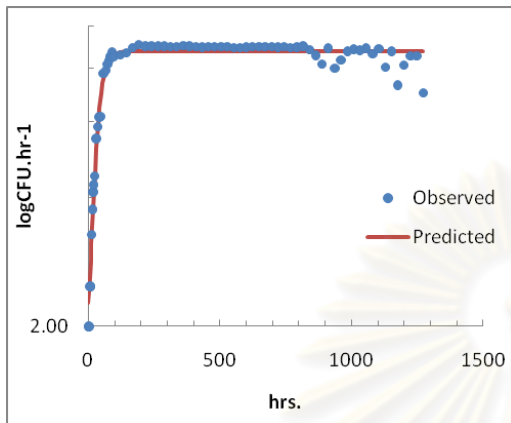


(4) 8%NaCl

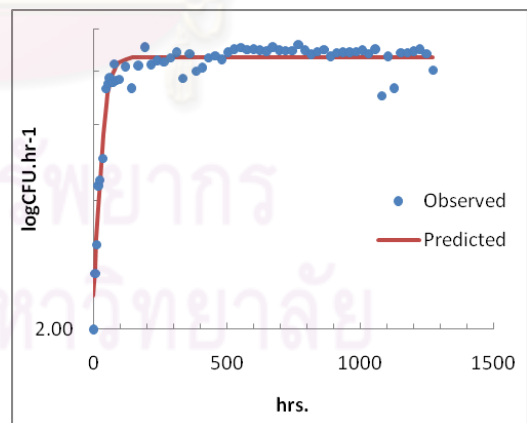
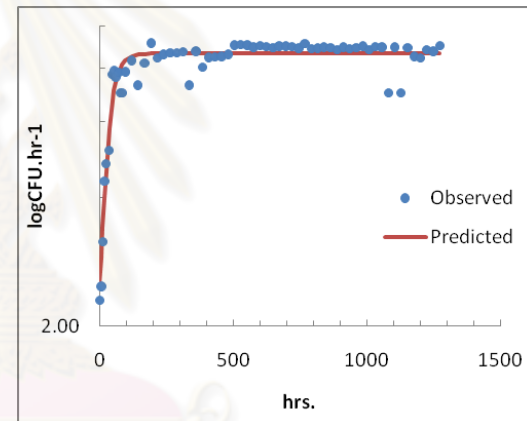
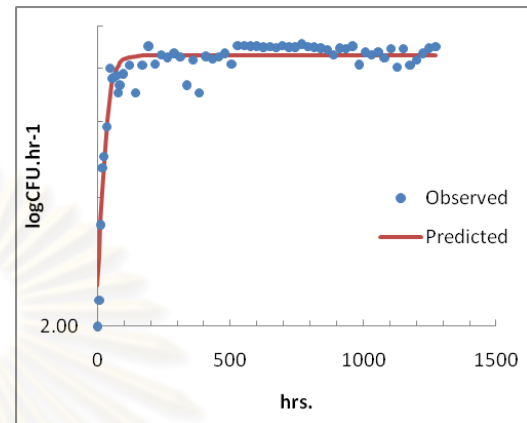


2.4 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

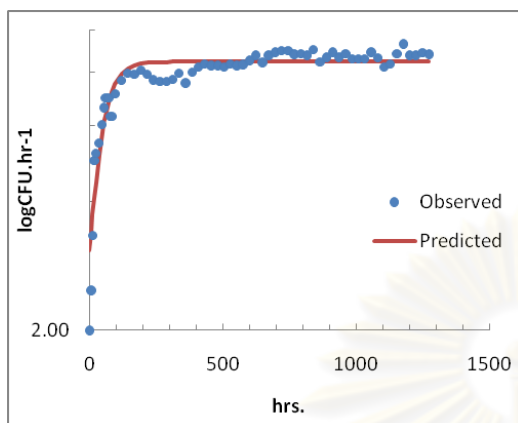
(1) 2%NaCl



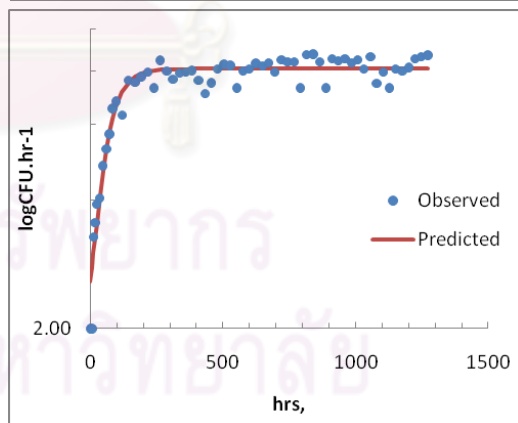
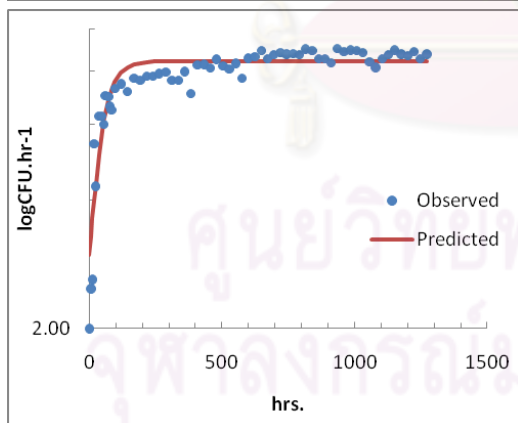
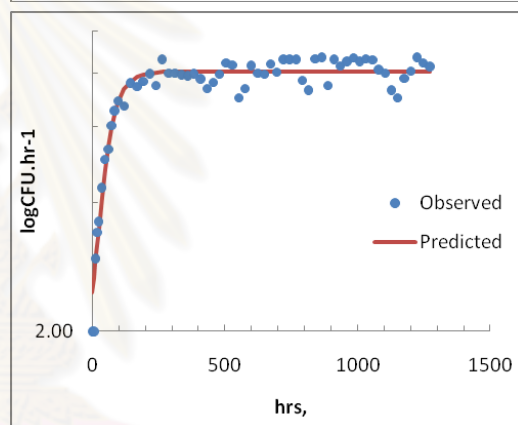
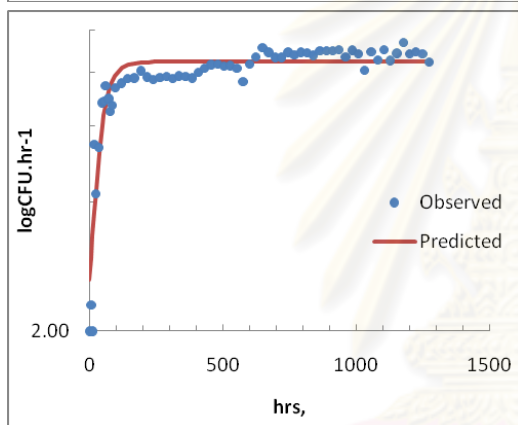
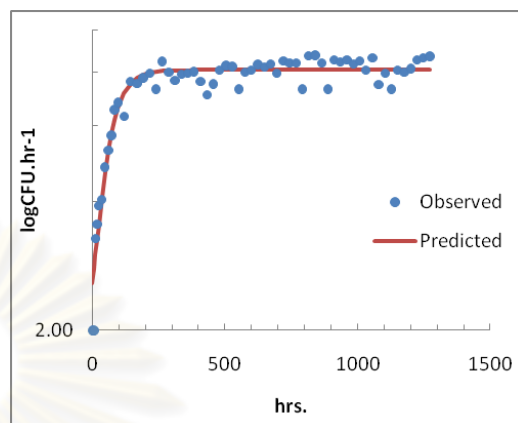
(2) 4%NaCl



(3) 6%NaCl

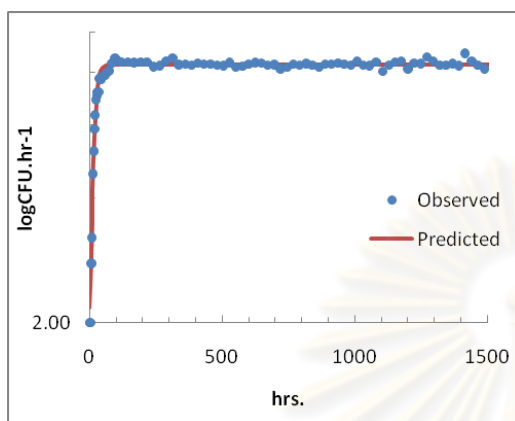


(4) 8%NaCl

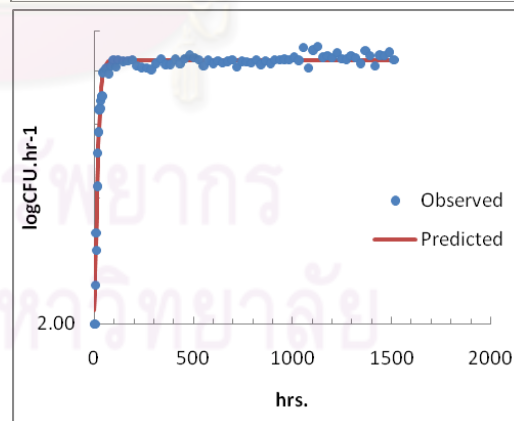
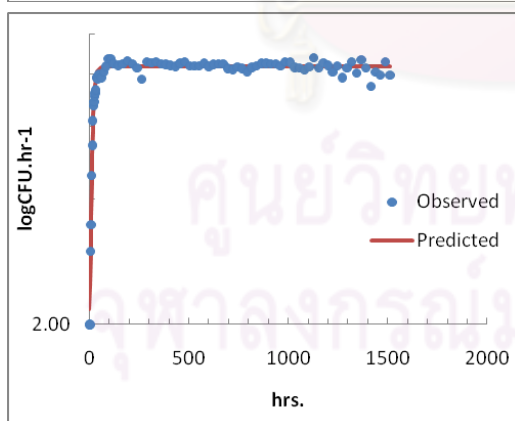
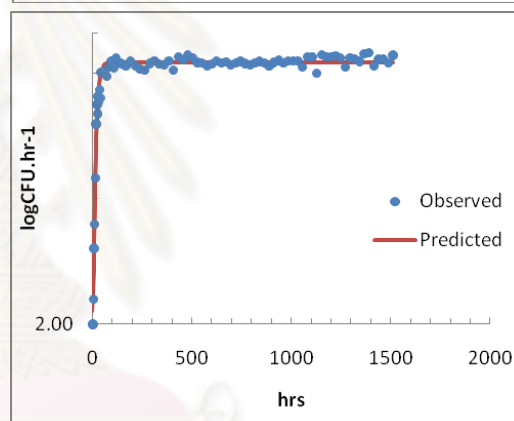
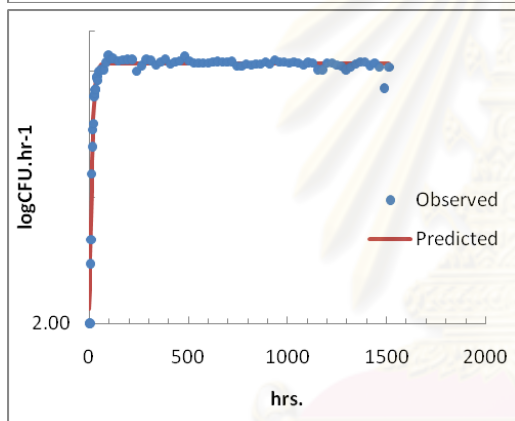
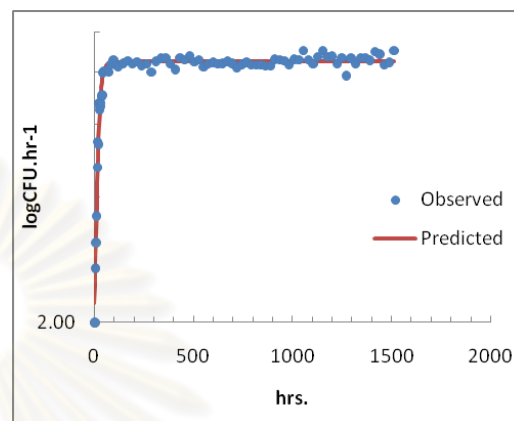


2.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

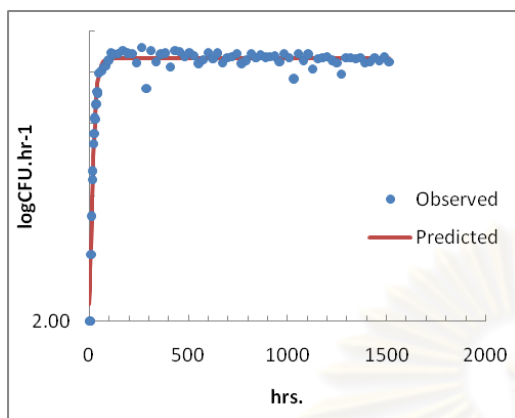
(1) 2%NaCl



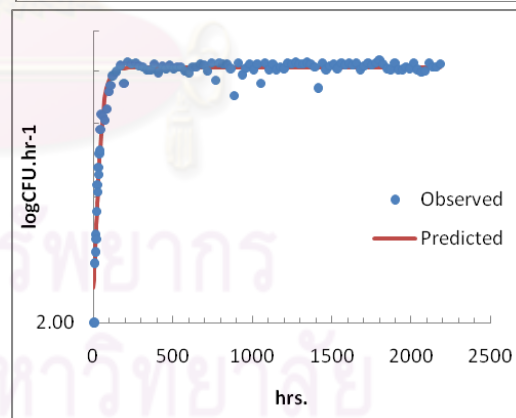
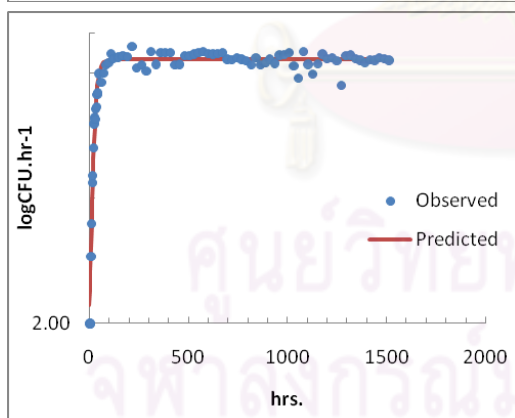
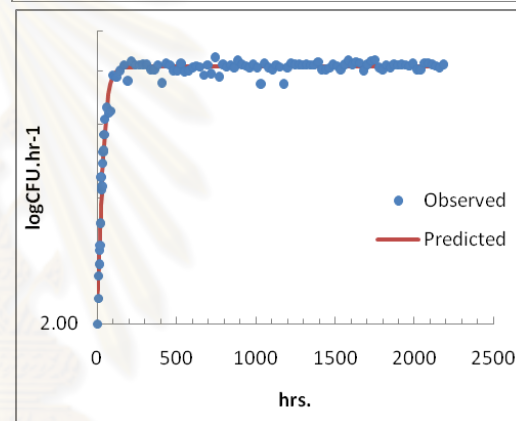
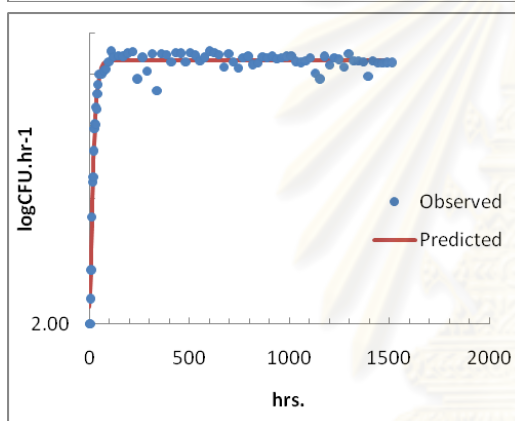
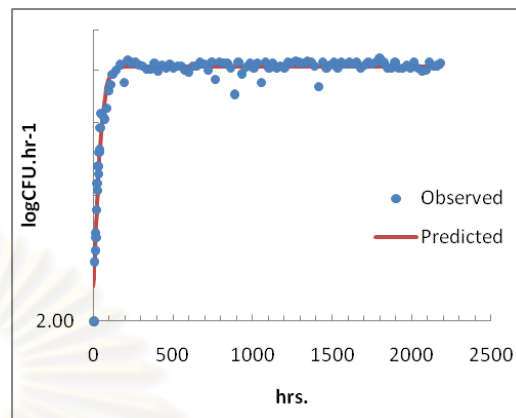
(2) 4%NaCl



(3) 6%NaCl



(4)8%NaCl



ภาคผนวก ค

1. ค่าการทำนายอัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยแบบจำลองคณิตศาสตร์ สำหรับที่อุณหภูมิระหว่าง 10-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ระหว่าง 0.979-0.950

$$\sqrt{r} = 0.061 \cdot \sqrt{a_w - 0.902} \cdot (T - 272.4)$$

a _w	Temp. (°C)	Growth rate (cfu.h ⁻¹)		%diff
		Predicted	observed	
0.979	25	0.192	0.245	21.537%
	20	0.125	0.121	3.300%
	15	0.072	0.088	18.039%
	10	0.034	0.038	11.288%
0.968	25	0.165	0.201	17.698%
	20	0.107	0.107	0.085%
	15	0.062	0.072	13.636%
	10	0.029	0.027	5.241%
0.950	25	0.121	0.171	29.27%
	20	0.079	0.067	18.312%
	15	0.045	0.051	10.819%
	10	0.021	0.010	104.015%

โดยมีค่า Bias factor เท่ากับ 1.033

Accuracy factor เท่ากับ 1.213

RMSE เท่ากับ 0.024

2. ค่าการทำนายอัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยแบบจำลองคณิตศาสตร์ $\sqrt{r} = \beta \sqrt{a_w - a_{wmin}} \cdot (T - T_{min})$ สำหรับที่อุณหภูมิระหว่าง 10-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ระหว่าง 0.979-0.950 ซึ่งใช้ค่า T_{min} และ a_{wmin} จำเพาะแต่ละคู่ของปัจจัย

β	T_{min}	a_{wmin}	a_w	Temp. (°C)	Growth rate (cfu.h ⁻¹)		%diff
					Predicted	observed	
0.061	270.4	0.903	0.979	25	0.217	0.245	11.21%
				20	0.146	0.121	20.98%
				15	0.089	0.088	1.42%
				10	0.046	0.038	21.59%
				5	0.017	0.023	28.24%
	271.0	0.901	0.968	25	0.183	0.201	8.50%
				20	0.122	0.107	13.85%
				15	0.073	0.072	2.41%
				10	0.036	0.027	34.43%
				5	0.012	0.018	31.31%
	272.8	0.898	0.950	25	0.124	0.171	27.02%
				20	0.080	0.067	20.73%
				15	0.045	0.051	10.12%
				10	0.020	0.010	100.64%
				5	0.005	0.004	22.78%
	275.5	0.906	0.947	25	0.079	0.085	7.26%
				20	0.048	0.057	16.13%
				15	0.024	0.012	105.07%
				10	0.009	0.004	101.40%
				5	0.001	0.005	78.16%

โดยมีค่า Bias factor	เท่ากับ	0.987
Accuracy factor	เท่ากับ	1.381
RMSE	เท่ากับ	0.015

3. ค่าการทำนายอัตราการเจริญเติบโตของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยแบบจำลองคณิตศาสตร์ $\sqrt{r} = \beta \sqrt{a_w - a_{wmin}} \cdot (T - T_{min})$ สำหรับที่อุณหภูมิระหว่าง 10-25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ระหว่าง 0.979-0.950 ซึ่งใช้ค่า T_{min} ที่จำเพาะแต่ละคู่ของปัจจัย

β	T_{min}	a_{wmin}	a_w	Temp. (°C)	Growth rate (cfu.h ⁻¹)		%diff
					Predicted*	observed	
0.061	270.4	0.902	0.979	25	0.220	0.245	10.04%
				20	0.148	0.121	22.58%
				15	0.090	0.088	2.76%
				10	0.046	0.038	23.19%
				5	0.017	0.023	27.30%
	271.0	0.902	0.968	25	0.181	0.201	9.87%
				20	0.120	0.107	12.15%
				15	0.072	0.072	0.88%
				10	0.036	0.027	32.43%
				5	0.012	0.018	32.34%
	272.8	0.902	0.950	25	0.115	0.171	32.61%
				20	0.074	0.067	11.48%
				15	0.042	0.051	17.01%
				10	0.019	0.010	85.27%
				5	0.005	0.004	13.37%
	275.5	0.902	0.947	25	0.086	0.085	1.67%
				20	0.052	0.057	8.05%
				15	0.027	0.012	124.84%
				10	0.009	0.004	120.82%
				5	0.001	0.005	76.06%

โดยมีค่า Bias factor	เท่ากับ	0.985
Accuracy factor	เท่ากับ	1.372
RMSE	เท่ากับ	0.016

ประวัติผู้เขียนงานวิจัย

นางสาวเสาวลักษณ์ อรรถนิवास เกิดเมื่อวันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดพิจิตร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ในปีการศึกษา 2541 และเข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวแพทยศาสตรอนสุข ภาควิชาสัตวแพทยศาสตรอนสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 234/433 หมู่บ้านนนทวัน-ศรีนครินทร์ ซอยนนทสิริ 24 ตำบลบางเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ 10270



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

