บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนา และทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับผลของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ เพื่อทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก โดยประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินการศึกษาวิจัย ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การสำรวจหา *L.monocytogenes* เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

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

ขั้นตอนที่ 3: การทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์ผลของอุณหภูมิต่ออัตาการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

ขั้นตอนที่ 4: การทวนสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำใช้ได้ และค่าสัมประสิทธิถดถดยของสมการที่ได้จากขั้นตอนที่ 3

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

ขั้นตอนที่ 6: การทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิ และเกลือโซเดียมคลดไรด์ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

3.1 การสำรวจหา *L. monocytogenes* จากเนื้อไก่ดิบ เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบ

3.1.1 วัตถุดิบ

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 ถุงพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง

3.1.2.8 ชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.1.2.9 Incubator อุณหภูมิ 25±1°C (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)

3.1.2.10 Incubator อุณหภูมิ 30±1°C (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)

3.1.2.11 Incubator อุณหภูมิ 35±1°C (รุ่น MIR 253, SANYO, JAPAN)

3.1.2.12 Incubator อุณหภูมิ 37±1°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 g ± 0.25 g. ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เท UVM broth ปริมาตร 225 ml. นำไปตีโดยเครื่อง Stomacher ที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ประมาณ 15-30 วินาที จากนั้นนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30±1°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.

3.1.4.2 เมื่อครบเวลาให้ถ่ายตัวอย่างที่ผ่านการบ่ม มา 0.1 ml. ใส่ลงใน Fraser broth ปริมาตร 10 ml แล้วนำเข้า บ่มที่อุณหภูมิ 35±1°C เป็นเวลา 48± 2 ชม.

3.1.4.3 เมื่อครบเวลาให้ใช้ loop ถ่ายตัวอย่างมา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA plate และ Oxford agar plate ชนิดละ 1 loop นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C และ 35±1°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 ขนาดประมาณ 2 มม. รอบๆโคนีมีสีดำ และ ตรงกลางโคโลนีนูน

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะตามข้างต้นจาก ALOA และ Oxford ชนิดละ 3 โคโลนี มา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA plate นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 35± 1°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 เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบมาเกลี่ยผสมให้เข้ากัน สังเกตการเกิดฟองแก๊ส หากเกิดฟองแก๊สภายใน 5 วินาทีให้ผลเป็นบวก

3.1.4.5.2 การย้อมแกรม (Gram ' stain) เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบนำไปย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของเซลล์ ซึ่งลักษณะของเชื้อ *L. monocytogenes* จะติดสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อชนิดแกรมบวก รูปร่างเป็นแบบท่อนสั้น

3.1.4.5.3 Motility test ใช้ needle เขี่ยเชื้อจากที่จะทดสอบใส่ลงใน Motility agar โดยวิธีการ stab ลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเข้าบ่มที่ 25±1°C เป็นเวลา 48±2 ชม. แล้วนำมาสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ โดยเชื้อ *L. monocytogenes* จะเจริญออกตามรอย stab แล้วแพร่ออกจากรอย stab มีลักษณะคล้ายร่ม (Umbrella-like)

3.1.4.5.4 Haemolysis test ใช้ Loop เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบมา streak ลงบน Sheep blood agar นำเข้าบ่มที่ 35±1°C เป็นเวลา 24±2 ชม. เพื่อทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง สังเกตการเกิด clear zone รอบๆโคโลนีของเชื้อที่เจริญ ซึ่งเชื้อ *L. monocytogenes* มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β-haemolysis

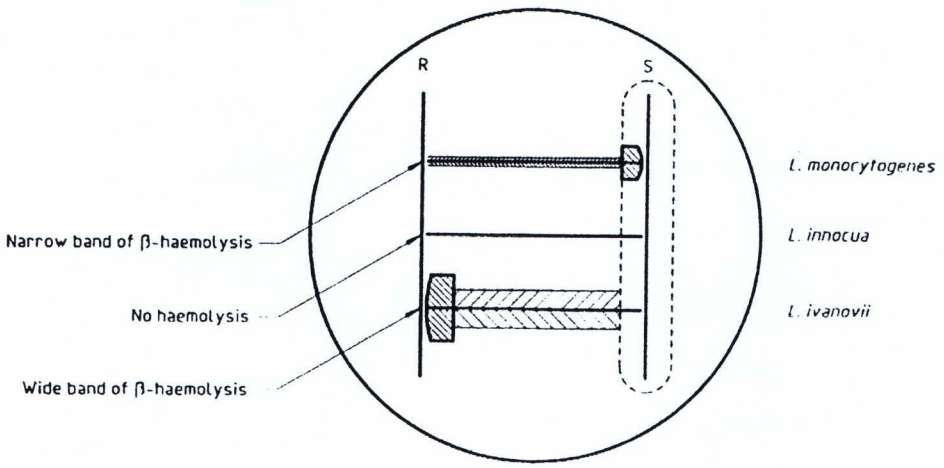
3.1.4.5.5 Carbohydrate utilization ใช้ Loop เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบลงใน Phenol red broth ที่ผสมน้ำตาล Xylose และ Phenol red broth ที่ผสมน้ำตาล Rhamnose นำเข้าบ่มที่ 35±1°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ชม.สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ carbohydrate ชนิดนั้นๆได้ ซึ่งเชื้อ *L. monocytogenes* มีคุณสมบัติสามารถใช้น้ำตาล Rhamnose ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ผสมน้ำตาล Rhamnose เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3.1.4.5.6 CAMP test ใช้ Needle เขี่ยเชื้อ *S. aureus* และ *R. equi* ขีดแบบ single line ลงบน CAMP medium โดยขีดให้เชื้อทั้ง 2

ชนิดอยู่ในด้านตรงกันข้ามกันในลักษณะคู่ขนาน ให้เชื้อ *R. equi* อยู่ด้านซ้าย และเชื้อ *S. aureus* อยู่ด้านขวา จากนั้นเขี่ยเชื้อที่จะทดสอบ มาขีดลากจากด้านเชื้อ *R equi* ไปทางเชื้อ *S. aureus* และให้มีระยะห่างจากเชื้อ *R. equi* และ *S. aureus* ประมาณ 1-2 mm. ตามรูปที่ 4 นำเข้าบ่มที่ 35±1°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 ต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *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 โดยคำนวนจากปริมาณสารละลายเจือจาง (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 แล้วคำนวนอัตราการเจริญของเชื้อ (r) ในแต่ละคู่ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นเกลือโซเดียม ตามสมการของ Gompertz

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

Growth rate (r) = BC/2.718 (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 เวลาที่มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

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

3.3 ทวนสอบแบบจำลองผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่ปรุงสุก

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

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

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 ค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (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

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

โดยที่ b คือ สัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการที่ (1)

β คือ regression coefficient หรือ สัมประสิทธิ์ถดถอย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

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) จะได้แบบจำลองผลของอุณหภูมิและเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes*

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

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

$$\sqrt{r} = \beta\sqrt{a_w - a_{w\min}} \qquad (4)$$

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 แบบจำลองสามารถใช้ทำนายค่าได้

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 :

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

โดย $\hat{y}$ คือ อัตราการเจริญที่ได้จากผลการทดลอง

y คือ อัตราการเจริญที่ได้จากการทำนายด้วยแลลจำลองคณิตศาสตร์