ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

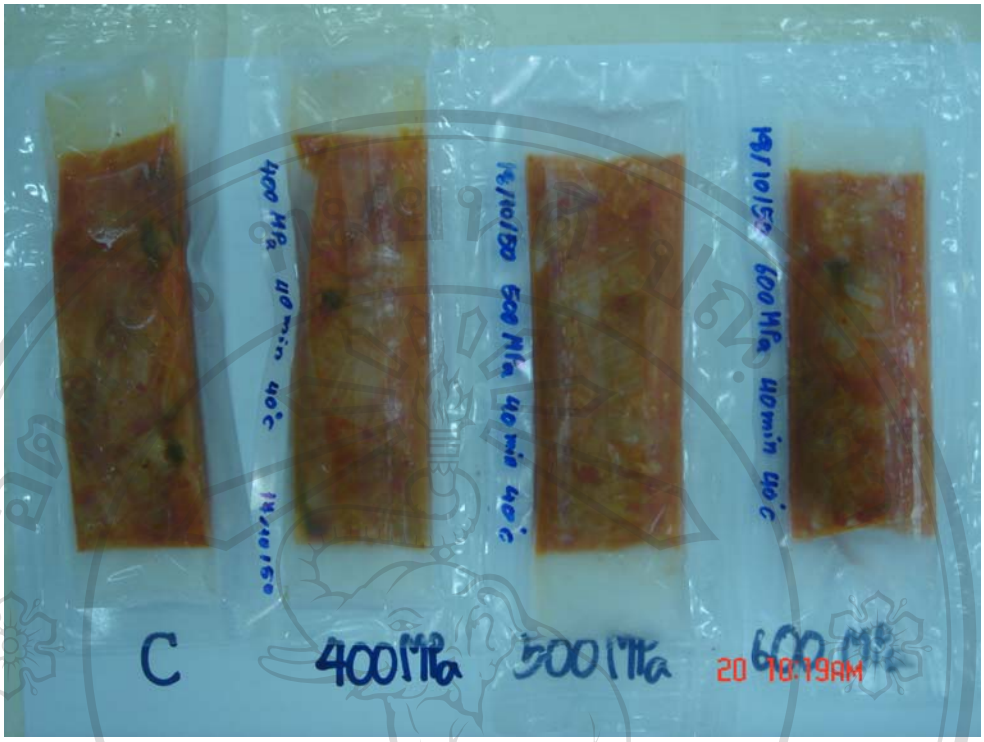
ภาพประกอบ

Lactobacillus plantarum

Leuconostoc mesenterodies

ภาพ ก-1ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Leuconostoc mesenterodies*บน MRS agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ชุดควบคุม 400 เมกะปาสคาลส์ 500 เมกะปาสคาลส์ 600 เมกะปาสคาลส์

ภาพ ก-2 กิมจิที่ผ่านความดันสูง 0.1 (ชุดควบคุม), 400, 500 และ 600 เมกะปาสคาลส์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.1 เมกะปาสคาลส์

600 เมกะปาสคาลส์

ภาพ ก-3 กิมจิหลังผ่านความดันสูง 0.1 (ชุดควบคุม) และ 600 เมกะปาสคาลส์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สัปดาห์ที่ 1

0.1 เมกะปาสคาลส์

600 เมกะปาสคาลส์

ภาพ ก-4 กิมจิหลังผ่านความดันสูง 0.1 (ชุดควบคุม) และ 600 เมกะปาสคาลส์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สัปดาห์ที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/g)	
	Leu. mesenterodies	*Lac. plantarum*
0	6.79	7.07
2	6.92	7.11
4	7.47	7.31
6	8.26	7.72
8	8.84	7.93
10	9.08	8.45
12	9.16	8.74
14	9.29	9.13
16	9.31	9.42
18	9.38	9.42
20	9.45	9.45
22	9.45	9.42
24	9.41	9.47
36	9.48	9.49

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและปริมารกรดแลคติกของกิมจิที่ผันแปรปริมาณการเติมเชื้อบริสุทธิ์ คือ เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* 2 ระดับ ในอัตราส่วน 1:1 (ชุดควบคุมไม่เติมเชื้อบริสุทธิ์) หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง			ปริมาณกรดแลคติก (%w/w)		
	ชุดควบคุม	ปริมาณเชื้อบริสุทธิ์		ชุดควบคุม	ปริมาณเชื้อบริสุทธิ์	
		6.43 log cfu/g	7.41 log cfu/g		6.43 log cfu/g	7.41 log cfu/g
0	5.35 ± 0.01	5.34 ± 0.01	5.33 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01
12	4.40±0.01	4.37 ± 0.01	4.36 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.01
24	4.38 ± 0.01	4.32 ± 0.01	4.25 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.003	0.46 ± 0.02
36	4.22 ± 0.01	4.10 ± 0.01	4.00 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.54 ± 0.02
48	4.17 ± 0.01	3.98 ± 0.01	3.75 ± 0.02	0.46 ± 0.004	0.56 ± 0.01	0.62 ± 0.04
60	4.01 ± 0.01	3.72 ± 0.01	3.65 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.80 ± 0.02
72	3.68 ± 0.01	3.61 ± 0.01	3.61 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.98 ± 0.04

หมายเหตุ

- ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 คุณภาพทางกายภาพก่อน และหลังหมักกิมจิที่หมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น คือ เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* ในอัตราส่วน 1:1 โดยเติมเชื้อ 2 ระดับความเข้มข้น คือ 6.43 log cfu/g และ 7.41 log cfu/g (ชุดควบคุมไม่เติมเชื้อบริสุทธิ์) หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

คุณภาพทางกายภาพ	กิมจิก่อนหมัก			กิมจิหลังหมัก *		
	ชุดควบคุม	ปริมาณเชื้อบริสุทธิ์		ชุดควบคุม	ปริมาณเชื้อบริสุทธิ์	
		6.43 log cfu/g	7.41 lob cfu/g		6.43 log cfu/g	7.41 log cfu/g
ค่าสี L	$74.53^{a} \pm 1.32$	$73.05^{ab} \pm 1.90$	$72.27^{bc} \pm 1.67$	$71.28^{d} \pm 0.16$	$72.41^{bcd} \pm 0.75$	$71.75^{cd} \pm 1.22$
ค่าสี a*	$-0.99^{a} \pm 0.37$	$-0.48^{b} \pm 0.96$	$-1.29^{a} \pm 0.88$	$0.43^{c} \pm 0.21$	$0.28^{c} \pm 0.21$	$0.39^{c} \pm 0.10$
ค่าสี b*	$12.16^{a} \pm 0.81$	$12.64^{a} \pm 2.13$	$12.98^{a} \pm 2.01$	$12.51^{a} \pm 1.22$	$11.98^{a} \pm 0.53$	$12.74^{a} \pm 2.98$
ค่าสี C	$12.20^{a} \pm 0.81$	$12.67^{a} \pm 2.13$	$13.06^{a} \pm 2.06$	$13.03^{a} \pm 1.23$	$12.60^{ab} \pm 1.03$	$12.34^{a} \pm 1.18$
ค่าสี h	$94.58^{a} \pm 1.62$	$92.50^{a} \pm 4.22$	$95.38^{a} \pm 3.41$	$83.80^{b} \pm 1.21$	$86.07^{b} \pm 0.27$	$85.73^{b} \pm 0.52$
ความแข็ง (force-g)	$69.85^{a} \pm 0.39$	$75.43^{b} \pm 1.70$	$70.14^{a} \pm 1.41$	$76.18^{bc} \pm 0.76$	$78.03^{c} \pm 3.23$	$75.91^{bc} \pm 0.24$

หมายเหตุ

- ตัวภาษาอังกฤษที่กำกับในแต่ละแถวที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($P \leq 0.05$)
- ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ
- * คือ วัดคุณภาพเมื่อกิมจิผ่านการหมัก 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 คุณภาพทางเคมี และกายภาพของกิมจิหลังผ่านความดันระดับ 0.1 (ชุดควบคุม), 400, 500 และ 600 เมกะปาสคาลส์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

คุณภาพทางเคมี / ทางกายภาพ	ระดับความดัน (MPa)			
	0.1	400	500	600
ความเป็นกรดด่าง	4.35 ^{a} ± 0.01	4.34 ^{ab} ± 0.01	4.35 ^{a} ± 0.01	4.33 ^{b} ± 0.01
ปริมาณกรดแลคติก (%w/w)	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01
ค่าสี L	69.94 ^{a} ± 0.50	70.62 ^{a} ± 0.54	69.55 ^{a} ± 0.57	69.01 ^{a} ± 0.40
ค่าสี a*	0.21 ^{a} ± 0.55	0.35 ^{a} ± 0.26	0.53 ^{a} ± 0.26	0.37 ^{a} ± 0.23
ค่าสี b*	9.17 ^{a} ± 0.55	9.97 ^{a} ± 0.34	10.45 ^{a} ± 0.18	12.12 ^{a} ± 0.30
ค่าสี C	10.67 ^{a} ± 1.99	11.14 ^{a} ± 2.30	11.75 ^{a} ± 2.38	12.64 ^{a} ± 2.63
ค่าสี h	92.53 ^{a} ± 1.97	91.99 ^{a} ± 3.56	90.33 ^{a} ± 3.86	91.13 ^{a} ± 1.59
ความแข็ง (force-g)	76.29 ^{a} ± 1.15	77.66 ^{a} ± 1.42	75.68 ^{a} ± 1.61	76.76 ^{a} ± 1.16

หมายเหตุ

- ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับในแต่ละแถวที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
- ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 คุณภาพทางเคมี ทางกายภาพและทางจุลชีววิทยา ของกิมจิหลังผ่านความดันระดับ 0.1 (ชุดควบคุม)และ 600 เมกะปาสคาลส์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

คุณภาพทางเคมี/กายภาพ	สัปดาห์ที่ 0		สัปดาห์ที่ 1		สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 3		สัปดาห์ที่ 4	
	0 MPa	600 MPa	0 MPa	600 MPa	0 MPa	600 MPa	0 MPa	600 MPa	0 MPa	600 MPa
ความเป็นกรดด่าง	4.35 $^{a\,b}$±0.01	4.33 ^{a} ± 0.01	4.34 $^{a\,b}$ ± 0.01	4.33 ^{a} ± 0.01	4.34 $^{a\,b}$±0.01	4.34 $^{a\,b}$±0.01	4.32 ^{a} ± 0.01	4.34 $^{a\,b}$±0.01	4.28 ^{a} ± 0.01	4.33 ^{a} ± 0.01
ปริมาณกรดแลคติก (%w/w)	0.34 ^{b} ± 0.01	0.34 ^{b} ± 0.01	0.34 ^{b} ± 0.01	0.34 ^{b} ± 0.01	0.35 ^{b} ± 0.01	0.34 ^{b} ± 0.01	0.36 $^{a\,b}$±0.01	0.34 ^{b} ± 0.01	0.38 ^{a} ± 0.01	0.34 ^{b} ± 0.01
ค่าสี L	59.94 ^{b}±1.00	49.01 ^{a}±1.39	50.76 $^{a\,b}$±1.00	47.97 ^{a}±1.45	53.10^{ab}±1.67	48.19 ^{a} ±1.72	52.62^{ab}±1.76	47.46 ^{a}±1.27	52.47^{ab}±1.26	46.73 ^{a}±1.54
ค่าสี a*	0.03 ^{a} ± 0.06	0.05 ^{a} ± 0.08	0.07 $^{a\,b}$ ± 0.04	0.04 ^{a} ± 0.19	0.07 $^{a\,b}$±0.02	0.06 $^{a\,b}$±0.05	0.10 $^{a\,b}$±0.16	0.07 $^{a\,b}$±0.13	0.25 ^{c} ± 0.13	0.09 $^{a\,b}$±0.17
ค่าสี b*	9.17 ^{a} ± 0.55	9.12 ^{a} ± 0.34	5.78 ^{a} ± 0.36	7.38 ^{a} ± 0.18	6.93 ^{a} ± 0.30	6.58 ^{a} ± 0.55	7.87 ^{a} ± 0.26	7.44 ^{a} ± 0.57	6.03 ^{a} ± 0.40	6.11 ^{a} ± 0.53
ความแข็ง (force-g)	76.29 ^{a}±5.59	76.76 ^{a}±2.73	72.15 ^{a} ± 1.19	75.60 ^{a}±1.27	76.95 ^{a}±2.90	79.50 ^{a}±1.59	68.50 ^{a}±1.87	78.60 ^{a}±2.25	72.88 ^{a}±3.17	78.61 ^{a}±2.66

หมายเหตุ - กิมจิชุดควบคุม (0.1 เมกะปาสคาลส์) และกิมจิชุดผ่านความดัน หมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น คือ เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณเชื้อละ 7.41 cfu/g

- ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

- ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับในแนวนอนที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 คุณภาพทางจุลชีววิทยา ของกิมจิหลังผ่านความดันระดับ 0.1 (ชุดควบคุม)และ 600 เมกะปาสคาลส์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

คุณภาพทางจุลชีววิทยา	สัปดาห์ที่ 0		สัปดาห์ที่ 1		สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 3		สัปดาห์ที่ 4	
	0.1 MPa	600 MPa	0.1 MPa	600 MPa	0.1 MPa	600 MPa	0.1 MPa	600 MPa	0.1 MPa	600 MPa
ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (log cfu/g)	7.02±0.07	ND	8.70±0.08	ND	8.30±0.09	ND	8.40±0.09	ND	8.60±0.09	ND
ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)	7.91 ±1.14	ND	7.63±0.01	ND	7.88±0.01	ND	7.80±0.02	ND	7.72±0.03	ND
เชื้อ *E. coli*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
เชื้อยีสต์ รา	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
เชื้อ *S. aureus*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ - กิมจิชุดควบคุม (0 MPa) และกิมจิชุดผ่านความดัน หมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น คือ เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณเชื้อละ 7.61 log cfu/g

- ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างการคำนวณ

1. วิธีการคำนวณการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Leuconostoc mesenteroides*

1.1 ถ่ายเชื้อ *Leu. mesenteroides* จาก MRS agar slant จำนวน 1 ห่วง ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MRS broth 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อประมาณ 9.31 log cfu/g (2.04×10^9 cfu/g)

1.2 เตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นโดยการล้างเชื้อ *Leu. mesenteroides* โดยใช้ 0.9% NaCl ในเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเชื้อที่ปั่นล้างครบ 3 ครั้ง มาเจือจางใน 0.9% NaCl จนมีปริมาณ 2 มิลลิลิตร

1.3 ต้องการเตรียมกิมจิ 2 กิโลกรัม ปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการหมักกิมจิปริมาณ 7 log cfu/g ให้คำนวณหาปริมาณเชื้อที่จะต้องเติมลงในกิมจิ ดังนี้

วิธีการคำนวณ

กิมจิ 1 g เติมเชื้อบริสุทธิ์ 10^7 cfu

กิมจิ 2000 g เติมเชื้อบริสุทธิ์ $\frac{10^7 \text{ cfu} \times 2000 \text{ g}}{1 \text{ g}}$

$= 2.0 \times 10^{10}$ cfu

ดังนั้น ต้องเติมเชื้อบริสุทธิ์ที่ประมาณ 2.0×10^{10} cfu ลงในกิมจิ 2 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีการคำนวณการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Lactobacillus plantarum*

2.1 ถ่ายเชื้อ *Lac. plantarum* จาก MRS agar slant จำนวน 1 ห่วง ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี MRS broth 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อประมาณ 9.42 log cfu/g (2.63×10^9 cfu/g)

1.2 เตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นโดยการล้างเชื้อ *Lac. plantarum* โดยใช้ 0.9% NaCl ในเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเชื้อที่ปั่นล้างครบ 3 ครั้ง มาเจือจางใน 0.9% NaCl จนมีปริมาณ 2 มิลลิลิตร

1.3 ต้องการเตรียมกิมจิ 2 กิโลกรัม ปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการหมักกิมจิปริมาณ 7 log cfu/g ให้คำนวณหาปริมาณเชื้อที่จะต้องเติมลงในกิมจิ ดังนี้

วิธีการคำนวณ

กิมจิ 1 g เติมเชื้อบริสุทธิ์ 10^7 cfu

กิมจิ 2000 g เติมเชื้อบริสุทธิ์ $\frac{10^7 \text{ cfu} \times 2000 \text{ g}}{1 \text{ g}}$

$= 2.0 \times 10^{10}$ cfu

ดังนั้น ต้องเติมเชื้อบริสุทธิ์ที่ประมาณ 2.0×10^{10} cfu ลงในกิมจิ 2 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิธีการคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของแบคทีเรียและระยะที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์ (generation time, g หรือ doubling time, t_d) (สิทธิสิน, 2542)

3.1 การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ)

ในขั้นของการเจริญอย่างรวดเร็ว (Log of Exponential growth phase) เส้นกราฟที่ได้ในช่วงนี้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงซึ่งสามารถนำมาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ได้ดังสมการดังต่อไปนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (1)$$

โดยกำหนดให้ x = ความเข้มข้นยองมวลของแบคทีเรีย

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย (ชั่วโมง $^{-1}$)

จากสมการที่ (1)

$$\frac{dx}{x} = \mu dt \qquad (2)$$

$$\int_x^x 1 \frac{dx}{x} = \int_t^t 1 = \mu dt \qquad (3)$$

$$\ln \frac{^x1}{_x0} = \mu (t_1 - t_0) \qquad (4)$$

$$\ln \frac{^x1}{_x0} = \mu \Delta t \qquad (5)$$

$$2.303 \log \frac{^x1}{_x0} = \mu \Delta t \qquad (6)$$

$$\log \frac{^x1}{_x0} = \frac{\mu \Delta t}{2.303} \qquad (7)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การคำนวณหาระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์ (generation time, g หรือ doubling time, t_d)

จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียที่คำนวณได้ สามารถนำค่าดังกล่าวมาหาระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์ได้ ภายใต้เงื่อนไขที่ว่าแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณ ซึ่งหมายถึง $X_1 = 2X_0$ เมื่อเวลาผ่านไป t_d ($t_1 - t_0$) จากสมการที่ (5) จะได้

$$\ln \frac{x_1}{x_0} = \mu (t_1 - t_0)$$

$$\ln \frac{2X_0}{x_0} = \mu t_d$$

$$t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของ *Leuconostoc mesenterodies*

จากกราฟการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* ช่วงการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 2-16 มีปริมาณเซลล์ ชั่วโมงที่ 2 (t_0) เท่ากับ 8.32 x 10^6 cfu/ml (x_0) และในชั่วโมงที่ 16 (t_1) เท่ากับ 2.04 x 10^9 cfu/ml. (x_1) นำไปแทนค่าในสมการ ดังนี้

$$\log \frac{x1}{x0} = \frac{\mu \Delta t}{2.303}$$

$$\log \frac{2.04 \times 10^9}{8.32 \times 10^6} = \frac{\mu\,(16 - 2)}{2.303}$$

$$\mu = \frac{2.39 \times 2.303}{14}$$

$$\mu = 0.39$$

3.4 วิธีการคำนวณระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์ (generation time, g หรือ doubling time, t_d) ของ *Leuconostoc mesenteroides*

$$t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

$$t_d = \frac{0.693}{0.39}$$

$$t_d = 1.78$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 วิธีการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของ *Lactobacillus plantarum*

จากกราฟการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* ช่วงการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 2-16 มีปริมาณเซลล์ ชั่วโมงที่ 2 (t_0) เท่ากับ 1.29 x 10^7 cfu/ml (x_0) และในชั่วโมงที่ 16 (t_1) เท่ากับ 2.63 x 10^9 cfu/ml. (x_1) นำไปแทนค่าในสมการ ดังนี้

$$\log \frac{x_1}{x_0} = \frac{\mu \Delta t}{2.303}$$

$$\log \frac{2.63 \times 10^9}{1.29 \times 10^7} = \frac{\mu\,(16 - 2)}{2.303}$$

$$\mu = \frac{2.31 \times 2.303}{14}$$

$$\mu = 0.38$$

3.6 วิธีการคำนวณระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์ (generation time, g หรือ doubling time, t_d) ของ *Lactobacillus plantarum*

$$t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

$$t_d = \frac{0.693}{0.38}$$

$$t_d = 1.82$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์คุณภาพ

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง ตามวิธีของ AOAC (2000)

สุ่มผลิตภัณฑ์กิมจิมาประมาณ 180 – 200 กรัม มาบดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องบดผสม จากนั้นชั่งตัวอย่างจำนวน 25 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ที่ได้มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.00 และ 7.00 ตามลำดับ วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก ตามวิธี AOAC (2000)

การเตรียมสารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH เข้มข้น 0.1 โมลาร์)

ชั่ง NaOH 8 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าขนาดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ละลายด้วยน้ำกลั่นต้มที่ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว ปรับปริมาตรให้ครบ 2000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยโพแทสเซียมไฮโดรเจนแทลเลต เข้มข้น 0.1 โมลาร์

2. สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนแทลเลต (Potassium Hydrogen Phthalate; $KHC_8H_4O_4$ เข้มข้น 0.1 โมลาร์)

นำ $KHC_8H_4O_4$ ประมาณ 5 กรัม อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน Desecrator ชั่ง $KHC_8H_4O_4$ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1.6338 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร คนให้ละลายเทใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

การคำนวณหาความเข้มข้นของ $KHC_8H_4O_4$

มวลโมเลกุลของ $KHC_8H_4O_4$ = 204.22

น้ำหนักของ $KHC_8H_4O_4$ ที่ชั่งได้ = 1.6338 กรัม

ละลายในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นของ $KHC_8H_4O_4$ = 1.6338 x 1000

= 204.22 x 100

= 0.0800 โมลาร์

3. ฟีนอฟทาลีน (Phenolpthaline; $C_{20}H_{14}O_4$) เข้มข้น 1%

ชั่ง Phenolpthaline 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร เติม ethalnol 95% จำนวน 60 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

ใช้สารละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนแทลเลต (Potassium hydrogen Phthalate) ที่เตรียมไว้ ทำการไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้การหาจุดยุติของการไตเตรชัน โดยวิธีโพเทนธิโอเมตริก ไตเตรชัน (Potentiometric titration) คือ หาจุดยุติโดยการใช้ เครื่องพีเอชมิเตอร์ จุดยุติคือเมื่อมีค่าพีเอช 8.2 คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

วิธีวิเคราะห์

สุ่มตัวอย่างอาหารประมาณ 180 – 200 กรัม นำไปปั่นละเอียด ชั่งตัวอย่างอาหารมา 20 – 40 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากันเทใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 – 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปิเปตส่วนที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำไปไตเตรทด้วย 0.1 โมลาร์ NaOH หาจุดยุติของการไตเตรทชันโดยใช้วิธีโพเทนธิโอเมตริก ไตเตรชัน (Potentionetric titration) คือหาจุดยุติโดยการใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ จุดยุติ คือ เมื่อมีค่าพีเอช 8.2 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลกติค (\%w/w)} = \frac{a.b.c.d \times 100}{e.f}$$

a = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรของการปรับปริมาตร (มิลลิลิตร)

c = ค่าสมดุลพอดีกับกรดแลคติก (กรัม)

d = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

e = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ (กรัม)

f = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

หมายเหตุ : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาสมดุลพอดีกับกรดแลคติก 0.009008 กรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ ตามวิธี AOAC (2000)

การเตรียมสารเคมี

1. ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver nitrate; $AgNO_3$) เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่ง $AgNO_3$ บริสุทธิ์ 99.9 – 100% ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 19.9880 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง นำสารที่ชั่งได้ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น ถ้า $AgNO_3$ มีความบริสุทธิ์น้อยกว่า 99.9 – 100% ให้นำสารละลายที่เตรียมได้ไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์

2. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl) เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่ง NaCl บริสุทธิ์ 99.9 – 100% และผ่านการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 0.5844 ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง นำสารที่ชั่งได้ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น

การคำนวณหาความเข้มข้นของ NaCl

มวลโมเลกุลของ NaCl = 58.44

น้ำหนักของ NaCl ที่ชั่งได้ = 0.5844 กรัม

ละลายในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

$$\text{ความเข้มข้นของ NaCl} = \frac{0.5844 \times 100}{58.44 \times 100}$$

= 0.1 โมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. โปรตัสเซียมโครเมต (Potassium Chromate; K_2CrO_4)

ชั่ง K_2CrO_4 4.2 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ชั่ง K_2CrO_4 0.7 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ใบเดิม

เติมน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร คนให้ละลาย เทใส่ขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับให้ครบด้วยน้ำกลั่น

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรท

ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำการไตเตรทกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เติมโปตัสเซียมโครเมตอินดิเคเตอร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ไตเตรท จนกระทั่งได้จุดยุติเป็นตะกอนสีส้มแดง คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไตเตรทโดยใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

วิธีวิเคราะห์

1. สุ่มตัวอย่างอาหารมาประมาณ 100 – 200 กรัม นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 – 20 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปคนให้เข้ากัน
3. เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 – 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น
4. นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4
5. ปิเปตของเหลวที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมโปตัสเซียมโครเมตอินดิเคเตอร์ 1 มิลลิลิตร
6. นำไปไตเตรทด้วย 0.1 โมลาร์ ซิลเวอร์ไนเตรท จุดยุติของสารละลายจะมีสีแดงอิฐ บันทึกผล (หากใช้ 0.1 โมลาร์ ซิลเวอร์ไนเตรทในการไตเตรทน้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร ให้เพิ่มปริมาณตัวอย่างหรือถ้าใช้มากกว่า 25 มิลลิลิตร ให้ลดตัวอย่างลง) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การคำนวณ

1 มิลลิลิตร ของสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับ NaCl 0.005844 กรัม) หรือคำนวณจากสูตร

$$\text{เกลือ (\%w/w)} = \frac{a.b.c \times 0.005844 \times 1000}{d.e}$$

a = ปริมาตรของ 0.1 โมลาร์ซิลเวอร์ไนเตรทที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรที่ปรับปริมาตร (มิลลิลิตร)

c = ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไตเตรท (โมลาร์)

d = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารที่ใช้ (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

e = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ก่อนและหลังอินเวอร์ชัน ตามวิธีของ Lane and Eynon (AOAC, 2000)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย Fehling's no.1

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate pentahydrate: $CuSO_4.5H_2O$) จำนวน 34.693 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

2. สารละลาย Fehling's no.2

ละลายโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท (Sodium potassium tartrate หรือ Rochelle salt: $NaKC_4O_6.4H_2O$) จำนวน 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

3. สารละลาย Carrez I

สารละลาย Zinc acetate dehydrate 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซิตริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

4. สารละลาย Carrez II

สารละลายโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

5. สารละลายเมธิลีนบลูเข้มข้นร้อยละ 1

สารละลายเมธิลีนบลู 1 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน (D1)

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประมาณ 20 – 40 กรัม ผสมน้ำกลั่น ปั่นนำของเหลวที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร เติม Clearing agent หรือสารละลาย Correz I และ Correz II อย่างละ 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำไปกรอง เก็บสารละลายใสที่กรองได้ไว้ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชัน (D1)

Preliminary titration

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 500 มิลลิลิตร (ชนิดปลายงอ) ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิเปตสารละลาย Fehling reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Fehling no.1 และ Fehling no.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใส่ Magnetic bar ลงไป นำไปต้มให้เดือดบน Magnetic stirrer ไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมธิลีนบลูลงไป 1- 2 หยด ไตเตรทจนสีฟ้าจางหายไปหมดเหลือแต่ตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15 – 50 มิลลิลิตร แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ให้ทำ Accurate titration ต่อไป

Accurate titration

ปิเปตสารละลาย Fehling reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Fehling no.1 และ Fehling no.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใส่ Magnetic bar ลงไป นำไปต้มบน Magnetic stirrer เติมสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรท ครั้งแรกประมาณ 1 – 2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือด หยดสารละลายเมธิลีนบลูลงไป 1 – 2 หยด แล้วไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เกิดตะกอนสีแดงอิฐ โดยไตเตรทให้เสร็จภายในเวลา 3 นาที ตั้งแต่เริ่มเดือดจดปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์หลังอินเวอร์ชั่น (D2)

นำสารละลายน้ำตาลที่เหลือจากการไตเตรทหาน้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปรับปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปรับปริมาตรเป็น 100 –

200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร แล้วทำการไตเตรทเช่นเดียวกับการหาน้ำตาลรีดิวส์ก่อนอินเวอร์ชัน

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ก่อนและหลังอินเวอร์ชันแล้ว สามารถหาปริมาณน้ำตาลซูโครส ได้ดังนี้

ร้อยละของน้ำตาลซูโครส = ร้อยละของผลต่าง $(D_2 - D_1) \times 0.95$

โดยที่ D_2 เท่ากับ ร้อยละของน้ำตาลรีดิวส์ทั้งหมดก่อนทำการอินเวอร์ชัน

D_1เท่ากับ ร้อยละของน้ำตาลรีดิวส์ทั้งหมดหลังทำการอินเวอร์ชัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

ค่าสี L a* b* และ L C h

การเตรียมตัวอย่าง

นำเฉพาะส่วนก้านของผักกาดขาวปลี มาวัดค่าสีโดยก่อนการวัดให้นำก้านผักกาดขาวปลีของกิมจิมาล้างในน้ำกลั่น 1 ครั้ง ซับน้ำให้แห้งก่อนการวัดสี โดยวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การวัดสี

1. การวัดสีในระบบ CIE L a* b* และ CIE L C h (Minolta Camera Co.,Ltd., 1991) การวัดสีในระบบ CIE L a* b* เป็นการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Minolta Camera Meter:Model CR300 ค่าสี L เป็นค่าความสว่าง (lightness) a* เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/Greeness) b* เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

เมื่อค่า L คือ ค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 – 100

การวัดสีในระบบ CIE L C h เป็นการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Minolta Camera Meter: Model CR 300 เป็นระบบวัดสีที่ได้จากการปรับปรุงระบบ CIE L a* b* โดยการเชื่อมค่า a* และ b* เข้ากับ hue (h) และ chroma (C)

เมื่อ L คือ ค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 – 100

ค่า L มีค่า 0 คือ มืด

ค่า L มีค่า 100 คือ สว่าง

ค่า h (hue angle) คือ ตัวเลขที่ระบุว่าสีมีตำแหน่งอยู่ที่ใดในกราฟ มีหน่วยเป็นองศา

โดย h (Hue angle) = tan-1(b/a)

ถ้า h = 0° แสดงว่าเป็นสีแดง

ถ้า h = 90° แสดงว่าเป็นสีเหลือง

ถ้า h = 180° แสดงว่าเป็นสีเขียว

ถ้า h = 270° แสดงว่าเป็นสีน้ำเงิน

ค่า C (Chroma) เป็นค่าความเข้มสี

โดย $C = (a^2 + b^2)1/2$

โดยค่า C มีค่าความเข้มสี มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (ค่าความแข็ง)

การเตรียมตัวอย่าง

นำเฉพาะส่วนก้านของผักกาดขาวปลีมาวัด โดยสุ่มก้านผักกาดขาวปลีมา 20 ชิ้น ต่อ 1 ตัวอย่าง นำไปวัดความแข็ง โดยใช้เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร (Texture Analyzer, Model TA.XTplus, UK)

ชนิดของหัววัด

Probe P/2N Needle probe -2 mm. diameter Stainless Stell Needel probe.
Load cell 50 kg.

การตั้งค่า

- Test mode Compression
- Pre-test speed 1.00 mm/sec
- Test speed 1.0 mm/sec
- Post test speed 10.00 mm/sec
- Target Mode Distance
- Distance 20.0 mm.
- Triger type Auto (force)
- Triger force 5.0 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

การหาปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- หม้อนึ่งความดัน
- หลอดทดลอง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar
- สารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้นร้อยละ 10

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ตัดตัวอย่างกิมจิจากบริเวณต่างๆ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที ได้อาหารที่มีความเจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1}) 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1: 100 หรือ (10^{-2})

1.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 1: 1000 หรือ (10^{-3})

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่าง ๆ (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่เจือจาง

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างโดยใส่อาหารจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อลง

2.4 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

หลังการบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25 – 250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้งสองจานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

การหาปริมาณแบคทีเรียแลคติค ตามวิธีของ BAM (2001)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- หม้อนึ่งความดัน
- หลอดทดลอง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth + Agar 15%

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ตัดตัวอย่างกิมจิ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที ได้อาหารที่มีความเจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1}) 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1: 100 หรือ (10^{-2})

1.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจาง 1: 1000 หรือ (10^{-3})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางต่าง ๆ (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากระดับความเข้มข้นที่เจือจางที่สุด

2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างโดยใส่อาหารจานละประมาณ 15 - 20 มิลลิลิตร

2.3 ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อลง

2.4 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 1 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

3. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

หลังการบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25 – 250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้งสองจานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

การวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- หม้อนึ่งความดัน
- หลอดทดลอง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticases soy broth + NaCl 10% (TSB-NaCl 10%)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Barid parker agar ที่เติม Potassium tellurite 3.5%
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion broth

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

1. ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ตัดตัวอย่างกิมจิ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 50 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 450 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที ได้อาหารที่มีความเจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1})

2. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1}) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth + NaCl 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วนำมา Streak ในอาหาร Baird Parker Medium ที่เติม Potassium tellurite 3.5% จำนวนตัวอย่างละ 2 Plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง

4. สังเกตโคโลนีที่มีสีดำ กลมนูน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 2 – 3 มิลลิเมตร มีวงแหวนขาวขุ่นล้อมรอบ ซึ่งมีวงแหวนใสๆ ล้อมรอบอีกชั้นหนึ่ง

5. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะดังข้อ 4 ลงใน Brain heart Infusion broth 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

6. ทดสอบ Coagulase test โดยการปิเปต plasma จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Brain heart Infusion Broth ที่มีเชื้ออยู่ เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบการแข็งตัวของ plasma หลังการบ่มเชื้อนาน 2, 4, และ 24 ชั่วโมง

การรายงานผล ถ้าผลการทดสอบ coagulase test positive ให้รายงานพบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 0.1 กรัม ถ้าไม่มีเชื้อที่มีลักษณะดังข้อ 4 หรือผลการทดสอบ coagulase test negative ให้รายงานไม่พบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 0.1 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาปริมาณ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN (Most probable number method) ตามวิธีของ AOAC (2000)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ตู้บ่มเชื้อ
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- หม้อนึ่งความดัน
- หลอดทดลอง และหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Brillant green lactose bile broth

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ใช้กรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ตัดตัวอย่างกิมจิ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ในถุงตีบด (Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 2 นาที ได้อาหารที่มีความเจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1})

1.2 เขย่าให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex) จะได้อาหารที่เจือจาง 1: 100 หรือ (10^{-2})

2. การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*

2.1 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ (1, 10^{-1} , และ 10^{-2}) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Sulphate Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและหลอดดักก๊าซ จำนวน 3 ชุด ชุดละ 3 หลอด

ชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

ชุดที่ 2 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

ชุดที่ 3 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

2.2 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (Positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดทดลองเลยแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่าง

2.3 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบ แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโคลิฟอร์มลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.4 บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 หลอดทดลองที่มีก๊าซเกิดขึ้นหรือให้ผลบวก (Positive) แสดงว่ามีแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* ให้ทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

3. การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

3.1 เขี่ยเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar ในจานเพาะเชื้อ

3.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

3.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* ซึ่งมีสีน้ำเงินอมดำตรงกลางมันเลื่อมอมเขียวสะท้อนแสง เขี่ยครั้งละ 1 โคโลนี ลงใน Tryptone water แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 ทดสอบสารอินโดล หลอดทดลองที่มีอินโดลเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นเชื้อ *E. coli* จากนั้นบันทึกจำนวนหลอดทดลองที่ให้ผลบวก (Positive) การทดสอบยืนยันเพิ่มเติมเกี่ยวกับ *E. coli* ควรทดสอบเมธิลเรด (Methyl red), โวเกส-พรอสเกาเออร์ (Voges-Proskauer) และซิเตรต (Citrate test)

3.5 คำนวณและรายงานค่า MPN ของ *E. coli* ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์กิมจิ 1 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ง-1 ค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของอาหาร ใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ความเข้มข้นละ 3 หลอด

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g
ตัวอย่าง 0.1 กรัม	ตัวอย่าง 0.01 กรัม	ตัวอย่าง 0.001 กรัม	
0	0	0	< 3
0	0	1	3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6.1
0	1	2	9.2
0	1	3	12
0	2	0	6.2
0	2	1	9.3
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9.4
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	3.6
1	0	1	.2
1	0	2	11
1	0	3	15
1	1	0	7.3
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	19
1	2	0	11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g
ตัวอย่าง 0.1 กรัม	ตัวอย่าง 0.01 กรัม	ตัวอย่าง 0.001 กรัม	
1	2	1	15
1	2	2	20
1	2	3	24
1	3	0	16
1	3	1	20
1	3	2	24
1	3	3	29
2	0	0	9.1
2	0	1	14
2	0	2	20
2	0	3	26
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	1	3	34
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	2	3	42
2	3	0	29
2	3	1	36
2	3	2	44
2	3	3	53
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g
ตัวอย่าง 0.1 กรัม	ตัวอย่าง 0.01 กรัม	ตัวอย่าง 0.001 กรัม	
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	> 1100

ที่มา : AOAC (2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนผักกาดดองมผช.๒๘๔ / ๒๕๔๗

มผช.๒๘๔/๒๕๔๗

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

ผักกาดดอง

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมเฉพาะผักกาดดองที่ผ่านกรรมวิธีการดอง บรรจุในภาชนะบรรจุ

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 ผักกาดดอง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำผักกาดเขียวปลีหรือผักกาดชนิดอื่นที่เหมาะสม ทั้งหัวหรือทำเป็นชิ้นตามขนาดที่ต้องการ อาจนำไปแช่ในน้ำปูนใสหรือสารช่วยทำให้กรอบก่อน เช่น แคลเซียมคลอไรด์ แคลเซียมแลกเทต นำมาดองในน้ำดอง ในระยะเวลาที่เหมาะสม หรือนำมาดองในน้ำปรุงรสอีกครั้ง

2.2 น้ำดอง หมายถึง ของเหลวที่ประกอบด้วยเกลือและอาจมีการเติมสารช่วยทำให้กรอบ

2.3 น้ำปรุงรส หมายถึง ของเหลวที่เตรียมจากส่วนประกอบต่างๆ เช่น เกลือ น้ำตาล ซีอิ๊ว พริก เครื่องเทศ และสารเพิ่มความเป็นกรด เช่น กรดซิตริก กรดแอซิติก และอาจมีการเติมสารช่วยทำให้กรอบ

2.4 น้ำหนักเนื้อ (drained weight) หมายถึง น้ำหนักของเนื้อผักกาดดองในภาชนะบรรจุที่ไม่รวมส่วนที่เป็นน้ำดอง หรือน้ำปรุงรส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. คุณลักษณะที่ต้องการ

3.1 ลักษณะทั่วไป ต้องมีลักษณะที่ดีตามธรรมชาติของผักกาดดอง อาจมีจำนวนชิ้นของผักกาดดองที่มีตำหนิได้บ้างเล็กน้อย หากมีน้ำดองหรือน้ำปรุงรสบรรจุอยู่ด้วย ต้องไม่มีฝ้าขาวหรือฟองอันเนื่องมาจากการหมัก

3.2 สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ ไม่คล้ำ

3.3 กลิ่นสี ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์

3.4 ลักษณะเนื้อสัมผัส ต้องกรอบพอควร ไม่นิ่มเละ เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 8.1 แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ 1 คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

3.5 สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

3.6 วัตถุเจือปนอาหาร

3.6.1 หากมีการใช้วัตถุกันเสีย ให้ใช้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

3.6.2 ห้ามใช้สีสังเคราะห์ทุกชนิด

3.6.3 ห้ามใช้โซเดียมบอเรต (บอแรกซ์)

3.6.4 หากมีการใช้สารเพิ่มความเป็นกรด ให้ใช้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

3.6.5 หากมีการใช้สารช่วยทำให้กรอบ ให้ใช้แคลเซียมคลอไรด์ แคลเซียมแลกเทต หรือแคลเซียมกลูโคเนตอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกัน ต้องไม่เกิน 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.6.6 ห้ามใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาลทุกชนิด

3.6.7 หากมีการใช้วัตถุปรุงแต่งรสอาหาร ให้ใช้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

3.7 ความเป็นกรด-ด่าง ต้องไม่เกิน 4.5

3.8 จุลินทรีย์

3.8.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 1×10^4 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.8.2 สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม

3.8.3 เอสเชอริเชีย โคไล โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.8.4 ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

4. สุขลักษณะ

4.1 สุขลักษณะในการทำผักดอง ให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก ก.

5. การบรรจุ

5.1 ให้บรรจุผักกาดดองในภาชนะบรรจุที่สะอาด ผนึกได้เรียบร้อย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้

5.2 น้ำหนักเนื้อของผักกาดดองในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ที่ภาชนะบรรจุผักกาดดองทุกหน่วยอย่างน้อยต้องมีเลขอักษรหรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่ายชัดเจน

(1) ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น ผักกาดดองเค็ม ผักกาดดองหวาน ผักกาดดองสมุนไพร ผักกาดดองสามรส

(2) ส่วนประกอบที่สำคัญ

(3) ชนิดและปริมาณวัตถุเจือปนอาหาร ถ้ามีการใช้วัตถุกันเสีย ให้ระบุข้อความ “ใช้วัตถุกันเสีย”

(4) น้ำหนักเนื้อ

(5) วัน เดือน ปีที่ทำ และวัน เดือน ปีที่หมดอายุ หรือข้อความว่า “ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)”

(6) ข้อแนะนำในการเก็บรักษา เช่น ควรเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

(7) ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

7. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

7.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ผักกาดดองที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ทำให้ระยะเวลาเดียวกัน

7.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

7.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.5 ข้อ 5. และข้อ 6. จึงจะถือว่าผักกาดดองรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบตามข้อ 7.2.1 แล้ว จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้ว

7.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง และจุลินทรีย์ให้ชักตัวอย่างเดียวโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 5 หน่วยภาชนะบรรจุ นำมาทำเป็นตัวอย่างรวม เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.6 ถึงข้อ 3.8 จึงจะถือว่าผักกาดดองรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.3 เกณฑ์ตัดสินตัวอย่างผักกาดดองต้องเป็นไปตามข้อ 7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การทดสอบ

8.1 การทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส

8.1.1 ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบผักกาดดองอย่างน้อย 5 คนแต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

8.1.2 วางตัวอย่างผักกาดดองในจานกระเบื้องสีขาว ตรวจสอบโดยการตรวจพินิจและชิม

8.1.3 หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การให้คะแนน (ข้อ 8.1.3)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสิน (คะแนน)			
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ต้องปรับปรุง
ลักษณะทั่วไป	ต้องมีลักษณะที่ดีตามธรรมชาติของผักกาดดอง อาจมีจำนวนชิ้นของผักกาดดองที่มีตำหนิได้บ้างเล็กน้อย หากมีน้ำดองหรือน้ำปรุงรสบรรจุอยู่ด้วย ต้องไม่มีฝ้าขาวหรือฟองอันเนื่องมากจากการหมัก	4	3	2	1
สี	ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ไม่คล้ำ	4	3	2	1
กลิ่นรส	ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์	4	3	2	1
ลักษณะเนื้อสัมผัส	ต้องกรอบพอควร ไม่นิ่มและ	4	3	2	1

8.2 การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ตรวจพินิจ

8.3 การทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง และน้ำหนักเนื้อให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

8.4 การทดสอบจุลินทรีย์ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือ BAM หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาตรฐาน Codex สำหรับกิมจิ
(CODEX STAN 223-2001)

CODEX STANDARD FOR KIMCHI
CODEX STAN 223-2001

1. SCOPE

This Standard applies the product known as kimchi, as defined in Section 2 below, which is prepared with Chinese cabbage as a predominant ingredient and other vegetables which have been trimmed, cut, salted and seasoned before fermentation.

2. DESCRIPTION

2.1 PRODUCT DEFINITION

Kimchi is the product:

a) prepared from varieties of Chinese cabbage, *Brassica pekinensis* Rupe.; such Chinese cabbages shall be free from significant defects, and trimmed to remove inedible parts, salted, washed with fresh water, and drained to remove excess water; the may or may not be cut into suitable sized pieces/parts;

b) processed with seasoning mixture mainly consisting of red pepper (*Capsicum annuum* L.) powder, garlic, ginger, edible Allium varieties other than garlic, and radish. These ingredients may be chopped, sliced and broken into pieces; and

c) fermented before or after being package into appropriate containers to ensure the proper ripening and preservation of the product by lactic acid production at lo temperatures.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 STYLES

The product should be presented in one of the following styles:

a) Whole: whole Chinese cabbage

b) Halves: Chinese cabbages divided lengthwise into halves;

c) Quarters: Chinese cabbages divided lengthwise into quarters; and

d) Slices or Chips: Chinese cabbage leaves cut into pieces of 1 - 6 cm in length and width

3. ESSENTIAL COMPOSITION AND QUALITY FACTORS

3.1 COMPOSITION

3.1.1 Basic Ingredients

a) Chinese cabbages and the seasoning mixture as described in Section 2;

b) salt (sodium chloride)

3.1.2 Other Permitted Ingredients

a) fruits;
b) vegetables other than those described in Section 2;
c) sesame seeds;
d) nuts;
e) sugars (carbohydrate sweeteners)
f) salted and fermented seafood;
g) glutinous rice paste;
h) wheat flour paste.

3.1.3 Other Composition

a) Total acidity (as lactic acid) not more than 1.0% w/w
b) Salt (sodium chloride) content 1.0– 4.0% w/w
c) Mineral impurities not more than 0.03% w/w

3.2 QUALITY CRITERIA

Kimchi shall have normal flavour, odour and colour and shall possess texture characteristic of the product.

3.2.1 Other Quality Criteria

a) Colour: The product should have red colour originating from red pepper.
b) Taste: The product should have hot and salty taste. It may also have sour tase.
c) Texture: The product should be reasonably firm, crisp, and chewy.

4. FOOD ADDITIVES

Only those Food additives listed below may used within the limits specified.

No	Name Of Food Additive	Maximum Level
4.1 ACIDITY REGULATORS		
269	Acetic acid	Limited by GMP
270	Lactic acid	Limited by GMP
330	Citric acid	Limited by GMP
4.2 FLAVOURINGS		
	Natural flavours and nature-identical	Limited by GMP
	flavous, as defined in the *Codex*	Limited by GMP
	Alimentarius, Volume 1A	Limited by GMP
4.3 FLAVOUR ENHANCERS		
621	Monosodium L-glutamate	Limited by GMP
627	Didodium 5'-guanylate	Limited by GMP
631	Sisodium 5'-inosinate	Limited by GMP
4.4 TEXTURIZERS		
420	Sorbitol	Limited by GMP

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 THICKRNING AND STABILIZING AGENTS

407 Carrageenan (including furcellaran)	Limited by GMP
415 Xanthan gum	Limited by GMP

5. CONTAMINANTS

5.1 HEAVY METALS

The products covered by the provisions of the Standard shall comply with those maximum levels for heavy metals established by the Codex Alimentarius Commission for these products.

5.2 PESTICIDE RESIDUES

The products covered by the provisions of this Standard shall comply with those maximum residue limits established by the Codex Alimentarius Commission for these product.

6. HYGIENE

6.1 It is recommended that the products covered by the provisions of this Standard be prepared and handled in accordance with the appropriate sections of the Recommended International Code of Practice-General Principles of Food Hygiene (CAC/RCP 1–1969, Rev. 3–1997), and other relevant Codex texts such as Codes of Hygienic Practice and Codes of Practice.

6.2 The products should comply with any microbiological criteria established in accordance with the Principles for the Establishment and Application of Microbiological Criteria for Foods (CAC/GL 21-1997)

7. WEIGHT AND MEASURES

7.1 FILL OF CONTAINER

7.1.1. Minimum Drained Weight

The drained weight of final product, as a percent of the indicated weight, shall not be less than 80% by weight.

8. LABELLING

8.1 Kimchi shall be labeled in accordance with the Codex General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods (CODEX STAN 1-1985, Rev. 1-1991).

8.2 THE NAME OF THE PRODUCT

The name of the product shall be “Kimchi”. The style should be included in close proximity to the name of the product.

8.3 LABELLING OF NON-RETAIL CONTAINERS

Information required in Sections 4.1-4.8 of the Codex General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods and storage instructions if necessary shall be given either identification, and the name and address of the manufacturer, packer, distributor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and/or importer, shall appear on the container. However, lot identification, and the name and address of the manufacturer, packer, distributor and/or importer may be replaced by an identification mark, provides that such a mark is clearly identifiable with the accompanying documents.

9. METHODS OF ANALYDID AND SAMPLING

See Codex Alimentarius Volume 13.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Bacteriological Analytical Manual Online
January 2001
Chapter 3
Aerobic Plate Count

The aerobic plate count (APC) is intended to indicate the level of microorganism in a product. Detailed procedures for determining the APC of foods have been developed by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) and the American Public Health Association (APHA). The conventional plate count method for examining frozen, chilled, precooked, or prepared foods, outlined below, conforms to AOAC *Official Methods of Analysis*, sec. 966.23, with one procedural change. The suitable colony counting range is 25-250. The automated spiral plate count method for the examination of foods and cosmetics, outlined below, conforms to AOAC *Official Methods of Analysis*, sec. 977.27. For procedural details of the standard plate count, see ref. 2.Guidelines for calculating and reporting plate counts have been changed to conform with the anticipated changes in the 16th edition of *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* and the *International Dairy Federation* (IDF) procedures.

Conventional Plate Count Method

A. Equipment and materials

1. Work area, level table with ample surface in room that is clean, well-lighted (100 foot-candles at working surface) and well-ventilated, and reasonably free of dust and drafts. The microbial density of air in working area, measured in fallout pour plates taken during plating, should not exceed 15 colonies/plate during 15 min exposure.
2. Storage space, free of dust and insects and adequate for protection of equipment and supplies
3. Petri dishes, glass or plastic (at least 15 x 90 mm)
4. Pipets with pipet aids (no mouth pipetting) or pipettors, 1, 5, and 10 ml, graduated in 0.1 ml units
5. Dilution bottles, 6 oz (160 ml), borosilicate-resistant glass, with rubber stoppers or plastic screw caps
6. Pipet and petri dish containers, adequate for protection
7. Circulating water bath, for tempering agar, thermostatically controlled to 45 ± 1°C
8. Incubator, 35 ± 1°C; milk, 32 ± 1°C
9. Colony counter, dark-field, Quebec, or equivalent, with suitable light source and grid plate
10. Tally register

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. Dilution blanks, 90 ± 1 ml Butterfield's phosphate-buffered dilution water (R11); milk, 99 ± 2 ml
12. Plate count agar (standard methods)
13. Refrigerator, to cool and maintain samples at 0-5°C; milk, 0-4.4°C
14. Freezer, to maintain frozen samples from -15 to -20°C
15. Thermometers (mercury) appropriate range; accuracy checked with a thermometer certified by the National Institute of Standards and Technology (NIST)

B. Procedure for analysis of frozen, chilled, precooked, or prepared foods

Using separate sterile pipets, prepare decimal dilutions of 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, and others as appropriate, of food homogenate by transferring 10 ml of previous dilution to 90 ml of diluent. Avoid sampling foam. Shake all dilutions 25 times in 30 cm (1 ft) arc within 7 s. Pipet 1 ml of each dilution into separate, duplicate, appropriately marked petri dishes. Reshake dilution bottle 25 times in 30 cm arc within 7 s if it stands more than 3 min before it is pipetted into petri dish. Add 12-15 ml plate count agar (cooled to 45 ± 1°C) to each plate within 15 min of original dilution. For milk samples, pour an agar control, pour a dilution water control and pipet water for a pipet control. Add agar to the latter two for each series of samples. Add agar immediately to petri dishes when sample diluent contains hygroscopic materials, e.g., flour and starch. Pour agar and dilution water control plates for each series of samples. Immediately mix sample dilutions and agar medium thoroughly and uniformly by alternate rotation and back-and-forth motion of plates on flat level surface. Let agar solidify. Invert solidified petri dishes, and incubate promptly for 48 ± 2 h at 35°C. Do not stack plates when pouring agar or when agar is solidifying.

C. Guidelines for calculating and reporting APCs in uncommon cases

Official Methods of Analysis does not provide guidelines for counting and reporting plate counts, whereas *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 16th ed. presents detailed guidelines; for uniformity, therefore, use APHA guidelines as modified .Report all aerobic plate counts computed from duplicate plates. For milk samples, report all aerobic plate counts computed from duplicate plates containing less than 25 colonies as less than 25 estimated count. Report all aerobic plate counts computed from duplicate plates containing more than 250 colonies as estimated counts. Counts outside the normal 25-250 range may give erroneous indications of the actual bacterial composition of the sample. Dilution factors may exaggerate low counts (less than 25), and crowded plates (greater than 250) may be difficult to count or may inhibit the growth of some bacteria, resulting in a low count. Report counts less than 25 or more than 250 colonies as estimated aerobic plate counts (EAPC). Use the following guide:

1. Normal plates (25-250). Select spreader-free plate(s). Count all colony forming units (CFU), including those of pinpoint size, on selected plate(s). Record dilution(s) used and total number of colonies counted.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Plates with more than 250 colonies. When number of CFU per plate exceeds 250, for all dilutions, record the counts as too numerous to count (TNTC) for all but the plate closest to 250, and count CFU in those portions of plate that are representative of colony distribution. See ref. 2 for detailed guidelines. Mark calculated APC with EAPC to denote that it was estimated from counts outside 25-250 per plate range (*see* D-3).
3. Spreaders. Spreading colonies are usually of 3 distinct types: 1) a chain of colonies, not too distinctly separated, that appears to be caused by disintegration of a bacterial clump; 2) one that develops in film of water between agar and bottom of dish; and 3) one that forms in film of water at edge or on surface of agar. If plates prepared from sample have excessive spreader growth so that (a) area covered by spreaders, including total area of repressed growth, exceeds 50% of plate area, or (b) area of repressed growth exceeds 25% of plate area, report plates as spreaders. When it is necessary to count plates containing spreaders not eliminated by (a) or (b) above, count each of the 3 distinct spreader types as one source. For the first type, if only one chain exists, count it as a single colony. If one or more chains appear to originate from separate sources, count each source as one colony. Do not count each individual growth in such chains as a separate colony. Types 2 and 3 usually result in distinct colonies and are counted as such. Combine the spreader count and the colony count to compute the APC.
4. Plates with no CFU. When plates from all dilutions have no colonies, report APC as less than 1 times the corresponding lowest dilution used. Mark calculated APC with asterisk to denote that it was estimated from counts outside the 25-250 per plate range. When plate(s) from a sample are known to be contaminated or otherwise unsatisfactory, record the result(s) as laboratory accident (LA).

D. Computing and recording counts

To avoid creating a fictitious impression of precision and accuracy when computing APC, report only the first two significant digits. Round off to two significant figures only at the time of conversion to SPC. For milk samples, when plates for all dilutions have no colonies, report APC as less than 25 colonies estimated count. Round by raising the second digit to the next highest number when the third digit is 6, 7, 8, or 9 and use zeros for each successive digit toward the right from the second digit. Round down when the third digit is 1, 2, 3, or 4. When the third digit is 5, round up when the second digit is odd and round down when the second digit is even.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Examples	
Calculated Count	**APC**
12,700	13,000
12,400	12,000
15,500	16,000
14,500	14,000

1. Plates with 25-250 CFU.

Formula: $N = \Sigma C / [(1 * n_1) + (0.1 * n_2)] * (d)$
a. Calculate the APC as follows:

$$\frac{31 + 30\,\text{colonies}}{0.0015\,\text{ml}} = 4.1 \times 10^4$$

where N = Number of colonies per ml or g of product
ΣC = Sum of all colonies on all plates counted
n_1 = Number of plates in first dilution counted
n_2 = Number of plates in second dilution counted
d = Dilution from which the first counts were obtained

Example

1:100	**1:1000**
232, 244	33, 28

$$N = \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0.1 \times 2)]10^2}$$

= 537/0.022

= 24,409

= 24,000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

b. When counts of duplicate plates fall within and without the 25-250 colony range, use only those counts that fall within this range.
2. All plates with fewer than 25 CFU. When plates from both dilutions yield fewer than 25 CFU each, record actual plate count but record the count as less than 25 x 1/d when d is the dilution factor for the dilution from which the first counts were obtained.

Example

Colonies		
1:100	**1:1000**	**EAPC/ml (g)**
18	2	<2,500
0	0	<2,500

3. **All plates with more than 250 CFU**. When plates from both 2 dilutions yield more than 250 CFU each (but fewer than 100/cm^2), estimate the aerobic counts from the plates (EAPC) nearest 250 and multiply by the dilution.

Example

Colonies		
1:100	**1:1000**	**EAPC/ml (g)**
TNTC	640	640,000

TNTC, too numerous to count.
EAPC, estimated aerobic plate count.
4. All plates with spreaders and/or laboratory accident. Report respectively as Spreader (SPR), or Laboratory Accident (LA).

5. All plates with more than an average of 100 CFU per sq cm. Estimate the APC as greater than 100 times the highest dilution plated, times the area of the plate. The examples below have an average count of 110 per sq cm.

Example

Colonies/Dilution		
1:100	**1:1000**	**EAPC/ml (g)**
TNTC	7,150[(a)]	>6,500,000 EAPC[(b)]
TNTC	6,490	>5,900,000 EAPC

[a] Based on plate area of 65 cm^2.

[b] EAPC, estimated APC.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

[c] Based on plate area of 59 cm^2.

Spiral Plate Method

The spiral plate count (SPLC) method for microorganisms in milk, foods, and cosmetics is an official method of the APHA and the AOAC . In this method, a mechanical plater inoculates a rotating agar plate with liquid sample. The sample volume dispensed decreases as the dispensing stylus moves from the center to the edge of the rotating plate. The microbial concentration is determined by counting the colonies on a part of the petri dish where they are easily countable and dividing this count by the appropriate volume. One inoculation determines microbial densities between 500 and 500,000 microorganisms/ml. Additional dilutions may be made for suspected high microbial concentrations.

A. Equipment and materials

1. Spiral plater (Spiral Systems Instruments, Inc., 7830 Old Georgetown Road, Bethesda, MD 20814)
2. Spiral colony counter (Spiral Systems) with special grid for relating deposited sample volumes to specific portions of petri dishes
3. Vacuum trap for disposal of liquids (2-4 liter vacuum bottle to act as vacuum reservoir and vacuum source of 50-60 cm Hg)
4. Disposable micro beakers, 5 ml
5. Petri dishes, plastic or glass, 150 x 15 mm or 100 x 15 mm
6. Plate count agar (standard methods)
7. Calculator (optional), inexpensive electronic hand calculator is recommended
8. Polyethylene bags for storing prepared plates
9. Commercial sodium hypochlorite solution, about 5% NaOCl (bleach)
10. Sterile dilution water
11. Syringe, with Luer tip for obstructions in stylus; capacity not critical
12. Work area, storage space, refrigerator, thermometers, tally, incubator, as described for Conventional Plate Count Method, above.
13. Sodium hypochlorite solution (5.25%). Available commercially.

B. Preparation of agar plates.

Automatic dispenser with sterile delivery system is recommended to prepare agar plates. Agar volume dispensed into plates is reproducible and contamination rate is low compared to hand-pouring of agar in open laboratory. When possible, use laminar air flow hood along with automated dispenser. Pour same quantity of agar into all plates so that same height of agar will be presented to spiral plater stylus tip to maintain contact angle. Agar plates should be level during cooling.

The following method is suggested for prepouring agar plates: Use automatic dispenser or pour constant amount (about 15 ml/100 mm plate; 50 ml/150 mm plate) of sterile agar at 60-70°C into each petri dish. Let agar solidify on level surface with poured plates stacked no higher than 10 dishes. Place solidified

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

agar plates in polyethylene bags, close with ties or heat-sealer, and store inverted at 0-4.4°C. Bring prepoured plates to room temperature before inoculation.

C. Preparation of samples.

As described in Chapter 1, select that part of sample with smallest amount of connective tissues or fat globules.

D. Description of spiral plater.

Spiral plater inoculates surface of prepared agar plate to permit enumeration of microorganisms in solutions containing between 500 and 500,000 microorganisms per ml. Operator with minimum training can inoculate 50 plates per h. Within range stated, dilution bottles or pipets and other auxiliary equipment are not required. Required bench space is minimal, and time to check instrument alignment is less than 2 min. Plater deposits decreasing amount of sample in Archimedean spiral on surface of prepoured agar plate. Volume of sample on any portion of plate is known. After incubation, colonies appear along line of spiral. If colonies on a portion of plate are sufficiently spaced from each other, count them on special grid which associates a calibrated volume with each area. Estimate number of microorganisms in sample by dividing number of colonies in a defined area by volume contained in same area. Studies have shown the method to be proficient not only with milk but also with other foods .

E. Plating procedure

Check stylus tip angle daily and adjust if necessary. (Use vacuum to hold microscope cover slip against face of stylus tip; if cover slip plane is parallel at about 1 mm from surface of platform, tip is properly oriented). Liquids are moved through system by vacuum. Clean stylus tip by rinsing for 1 s with sodium hypochlorite solution followed by sterile dilution water for 1 s before sample introduction. This rinse procedure between processing of each sample minimizes cross-contamination. After rinsing, draw sample into tip of Teflon tubing by vacuum applied to 2-way valve. When tubing and syringe are filled with sample, close valve attached to syringe. Place agar plate on platform, place stylus tip on agar surface, and start motor. During inoculation, label petri plate lid. After agar has been inoculated, stylus lifts from agar surface and spiral plater automatically stops. Remove inoculated plate from platform and cover it. Move stylus back to starting position. Vacuum-rinse system with hypochlorite and water, and then introduce new sample. Invert plates and promptly place them in incubator for 48 ± 3 h at 35 ± 1°C.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

F. Sterility controls

Check sterility of spiral plater for each series of samples by plating sterile dilution water. CAUTION: Prepoured plates should not be contaminated by a surface colony or be below room temperature (water can well-up from agar). They should not be excessively dry, as indicated by large wrinkles or glazed appearance. They should not have water droplets on surface of agar or differences greater than 2 mm in agar depth, and they should not be stored at 0-4.4°C for longer than l month. Reduced flow rate through tubing indicates obstructions or material in system. To clear obstructions, remove valve from syringe, insert hand-held syringe with Luer fitting containing water, and apply pressure. Use alcohol rinse to remove residual material adhering to walls of system. Dissolve accumulated residue with chromic acid. Rinse well after cleaning.

G. Counting grid

1. **Description.** Use same counting grid for both 100 and 150 mm petri dishes. A mask is supplied for use with 100 mm dishes. Counting grid is divided into 8 equal wedges; each wedge is divided by 4 arcs labeled l, 2, 3, and 4 from outside grid edge. Other lines within these arcs are added for ease of counting. A segment is the area between 2 arc lines within a wedge. Number of areas counted (e.g., 3) means number of segments counted within a wedge. Spiral plater deposits sample on agar plate in the same way each time. The grid relates colonies on spiral plate to the volume in which they were contained. When colonies are counted with grid, sample volume becomes greater as counting starts at outside edge of plate and proceeds toward center of plate.
2. **Calibration.** The volume of sample represented by various parts of the counting grid is shown in operator's manual that accompanies spiral plater. Grid area constants have been checked by the manufacturer and are accurate. To verify these values, prepare 11 bacterial concentrations in range of 10^6-10^3 cells/ml by making 1:1 dilutions of bacterial suspension (use a nonspreader). Plate all Incubate both sets of plates for 48 ± 3 h at 35 ± 1°C. Calculate concentrations for each dilution. Count spiral plates over grid surface, using counting rule of 20 (described in H, below), and record number of colonies counted and grid area over which they were counted. Each spiral colony count for a particular grid area, divided by aerobic count/ml for corresponding spirally plated bacterial concentrations, indicates volume deposited on that particular grid area. Use the following formula:

$$\text{Volume (ml) for grid area} = \frac{\text{Sprial colonies counted in area}}{\text{Bacterial count/ml (APC)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Example :

$$\text{Volume (ml)} = \frac{31+30 \text{ colonies}}{4.1\times10^{4} \text{ bacteria/ml}}$$
$$= 0.0015 \text{ ml}$$

To check total volume dispensed by spiral plater, weigh amount dispensed from stylus tip. Collect in tared 5 ml plastic beaker and weigh on analytical balance (± 0.2 mg).

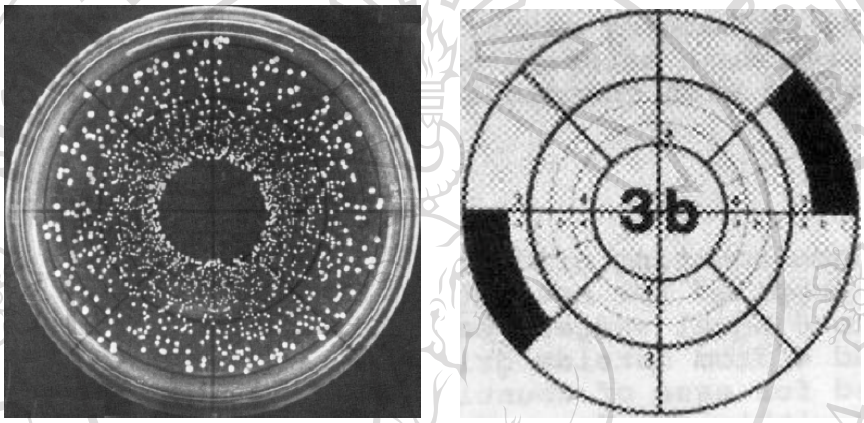


Figure 1. 10 cm plate, area (3b)

$$\frac{31+30 \text{ colonies}}{0.0015 \text{ ml}} = 4.1\times10^{4}$$

H. Examination and reporting of spiral plate counts.

Counting rule of 20. After incubation, center spiral plate over grid by adjusting holding arms on viewer. Choose any wedge and begin counting colonies from outer edge of first segment toward center until 20 colonies have been counted. Complete by counting remaining colonies in segment where 20th colony occurs. In this counting procedure, numbers such as 3b, 4c (Fig. l) refer to area segments from outer edge of wedge to designated arc line. Any count irregularities in sample composition are controlled by counting the same segments in the opposite wedge and recording results. Example of spirally inoculated plate (Fig. l) demonstrates method for determining microbial count. Two segments of each wedge were counted on opposite sides of plate with 31 and 30 colonies, respectively. The sample volume contained in the darkened segments is 0.0015 ml. To estimate number of microorganisms, divide count by volume contained in all segments counted. See example under Fig. l.

If 20 CFU are not within the 4 segments of the wedge, count CFU on entire plate. If the number of colonies exceeds 75 in second, third, or fourth segment, which also contains the 20th colony, the estimated number of microorganisms will generally be low because of coincidence error associated with crowding of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

colonies. In this case, count each circumferentially adjacent segment in all 8 wedges, counting at least 50 colonies, e.g., if the first 2 segments of a wedge contain 19 colonies and the third segment contains the 20th and 76th (or more), count colonies in all circumferentially adjacent first and second segments in all 8 wedges. Calculate contained volume in counted segments of wedges and divide into number of colonies.

When fewer than 20 colonies are counted on the total plate, report results as "less than 500 estimated SPLC per ml." If colony count exceeds 75 in first segment of wedge, report results as "greater than 500,000 estimated SPLC per ml." Do not count spiral plates with irregular distribution of colonies caused by dispensing errors. Report results of such plates as laboratory accident (LA). If spreader covers entire plate, discard plate. If spreader covers half of plate area, count only those colonies that are well distributed in spreader-free areas.

Compute SPLC unless restricted by detection of inhibitory substances in sample, excessive spreader growth, or laboratory accidents. Round off counts as described in I-D, above. Report counts as SPLC or estimated SPLC per ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวสุวรรณี ชัยชนะ	
วัน เดือน ปี เกิด	3 ตุลาคม 2523	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2542	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนารีรัตน์จังหวัดแพร่
	พ.ศ. 2546	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved