บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบสำหรับการผลิตเต้าเจี้ยว

1.1 ถั่วเหลือง

1.2 แป้งสาลีที่จำหน่ายในท้องตลาด 3 ยี่ห้อ

1.2.1 แป้งสาลีตราว่าว

1.2.2 แป้งสาลีตราใบไม้

1.2.3 แป้งสาลีตรากุหลาบ

1.3 เกลือป่นละเอียด

2. จุลินทรีย์

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเต้าเจี้ยว

2.1.1 *Aspergillus oryzae* ลักษณะเป็นผงสีเขียวมีจำหน่ายในท้องตลาดสำหรับผลิตซีอิ้วและเต้าเจี้ยว ถุงละ 20 กรัม

2.1.2 *Aspergillus oryzae* จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตแบคเทอริโอซิน

Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus* (SN 11) จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทส้มฟัก (ศิรินาถ หนูเอก, 2540)

/

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพยับยั้ง

Bacillus cereus ATCC 11778 จากห้องปฏิบัติการอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหาร De Man Rogusa Sharpe(MRS) (บริษัทMerck) และMedium I สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) (ภาคผนวก ก)

3.2 อาหาร Nutrient Agar (NA) (บริษัท Difco) สำหรับเทรองพื้นจานเพาะเลี้ยงเชื้อในการทดสอบกิจกรรมยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

3.3 อาหาร Mannitol-Egg Yolk-Kanamycin Agar (MYK) (บริษัท Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* (ภาคผนวก ก)

3.4 อาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) (บริษัท Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* (ภาคผนวก ก)

3.5 อาหาร Trypticase Soy Kanamycin Broth (TSK) (บริษัท Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* (ภาคผนวก ก)

3.6 อาหาร Nutrient Agar with Manganese Sulfate Agar (NMSA) สำหรับผลิตสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778 (ภาคผนวก ก)

4. สารเคมี

4.1 สารละลาย Tween 80 (บริษัท Merck) เข้มข้น 100 ppm และ 200 ppm (w/v)

4.2 สารละลาย Tri-sodium phosphate (บริษัท Merck) เข้มข้น ร้อยละ 5 และ 10 (w/v)

4.3 สารละลาย Dialkyldimethylammonium chloride (บริษัท Merck) เข้มข้น 100 ppm และ 200 ppm (w/v)

4.4 สารละลาย Sodium hypochorite (คลอรีนอิสระ ร้อยละ 8.8) (บริษัท วิทยาศรม) เข้มข้น 100 ppm และ 200 ppm

4.5 สารละลาย Calcium hypochorite (คลอรีนอิสระ ร้อยละ 30) (บริษัท วิทยาศรม) เข้มข้น 100 ppm และ 200 ppm

4.6 สารละลาย Kanamycin

4.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน (ภาคผนวก ข)

4.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ Sartorius บริษัท S.V. Medico Co., LTD.
2. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Lambda 20 บริษัท Perkin Elmer, Co., LTD.
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Jouan บริษัท S.V. Medico Co., LTD
4. เครื่องวัดพีเอช รุ่น Cyberscan1000 บริษัท S.V. Medico Co., LTD.
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert GmbH Co. KG
6. ตู้อบอากาศร้อน (hot air oven) บริษัท Memmert GmbH Co. KG
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) MDH Type A บริษัท จำกัด
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ TOMY รุ่น ss7325 บริษัท ไทยวิคตอรี่ จำกัด
9. ปั๊ม Peristaltic รุ่น S/N 1291 บริษัท S.V. Medico Co., LTD.
10. ไมโครเวฟ ยี่ห้อชาร์ป รุ่น R-311
11. เครื่องนับเชื้อจุลินทรีย์ ยี่ห้อ Suntex รุ่น Suntex 560 ประเทศไต้หวัน
12. เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและเคมี
13. อุปกรณ์ใช้ผลิตเต้าเจี้ยว

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาแหล่งปนเปื้อนของ *B. cereus* ในการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกร

สำรวจการผลิตของกลุ่มเกษตรกรในจังหวัดตรัง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มวัดกลางพัฒนาเป็นกลุ่มที่ได้รับการรับรองคุณภาพแล้วและกลุ่มบ้านปากคมซึ่งเป็นกลุ่มที่พบเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์

1.1 ศึกษาข้อมูลการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกร โดยใช้แบบสำรวจ (ภาคผนวก จ)

1.2 ศึกษาปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบ อุปกรณ์และกระบวนการผลิตเต้าเจี้ยว เพื่อทราบแหล่งปนเปื้อนของเชื้อ โดยการสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี aseptic technique ปริมาณ 100 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง สำหรับอุปกรณ์ทั้งหมดใช้วิธีสวอป บนพื้นผิวที่สัมผัสกับตัวอย่างในพื้นที่ประมาณ 25 ตารางเซนติเมตร

1.2.1 ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบ ได้แก่ ถั่วเหลือง แป้งสาลี เกลือและหัวเชื้อ *A. oryzae* รวมถึงวัตถุดิบในขั้นตอนต่างๆของการเตรียมเช่น วัตถุดิบเริ่มต้น ถั่วเหลืองหลังจากล้างน้ำ ถั่วเหลืองหลังจากแช่น้ำ 1 คืน ถั่วเหลืองที่ผ่านการให้ความร้อน ถั่วเหลืองที่วางพักให้เย็นและแป้งสาลีหลังจากคั่วให้ความร้อน ด้วยวิธี MPN Technique (A.O.A.C., 1999) และความชื้นด้วยวิธี Gravimetric method (A.O.A.C., 1999)

การวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมด โดยนำตัวอย่างปริมาณ 25 กรัม ใส่เครื่องปั่นปราศจากเชื้อ เติมบัฟเฟอร์ 225 มิลลิลิตร ปั่นนาน 2.5 นาที หรือใช้ถุงตีบด ใช้เวลา 1 นาที ได้ตัวอย่างเจือจาง 1 :10 แล้วเจือจางตัวอย่างให้ได้ 1: 100 และ 1: 1,000 ด้วยบัฟเฟอร์ แล้วปิเปตตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางใส่ในหลอดอาหาร TSK ความเจือจางละ 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร บ่มหลอดอาหาร TSK ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่ขุ่นลงบนอาหารแข็ง MYK บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของสปอร์ โดยการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการหาปริมาณเซลล์ทั้งหมด แล้วต้มให้ความร้อนหลอดตัวอย่างที่เจือจาง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วปิเปตใส่ในหลอดอาหาร TSK แล้วทำเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณเซลล์ทั้งหมด

ตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* โดยเก็บโคโลนีที่มีสีชมพูและรอบ ๆ โคโลนีมีตะกอนขุ่นสีชมพู บนอาหารแข็ง MYK สร้างเอนไซม์เลกซิติเนสและไม่ใช้น้ำตาลแมนนิทอล แล้วย้อมสีแกรม ย้อมสีสปอร์ ศึกษารูปร่างและความสามารถของการสร้างคะตา-เลส การเคลื่อนที่ การย่อยสลายไทโรซีน การย่อยสลายไลโซซายน์ การสร้างกรดในสภาวะไร้อากาศ และย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งถ้าเป็นเชื้อ *B. cereus* จะติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ และให้คะตาเลสบวก เคลื่อนที่ได้ ย่อยสลายไทโรซีน ไลโซซายน์ได้ สร้างกรดในสภาวะไร้อากาศ และย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์

1.2.2 ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* บนอุปกรณ์ ได้แก่ กระด้งไม้ไผ่ ตะกร้าพลาสติก และโอ่งเคลือบ ก่อนใช้งาน ด้วยวิธีสวอปบริเวณที่สัมผัสกับอาหารทั้งหมด และวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN technique (A.O.A.C., 1999)

1.2.3 ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ในการผลิตโคจิและเต้าเจี้ยว ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999) บนอาหารแข็ง MYK บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1

การวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของสปอร์ โดยการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการหาปริมาณเซลล์ทั้งหมด แล้วต้มให้ความร้อนหลอดตัวอย่างที่เจือจาง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วปิเปตตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร แต่ละความเจือจางลงบนอาหารแข็ง MYK แล้วทำเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณเซลล์ทั้งหมด แล้วตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1

2. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลี

สุ่มตัวอย่างแป้งสาลีชนิดต่าง ๆ ดังนี้ คือ แป้งที่มีจำหน่ายในตลาด 3 ยี่ห้อ แป้งที่ผ่านการบดใหม่ และ แป้งดัดแปร (modified starch) น้ำหนัก 25 กรัม เพื่อวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี MPN Technique (A.O.A.C., 1999) และวิเคราะห์ ความชื้นด้วยวิธี Gravimetric method (A.O.A.C., 1999)

4. ศึกษาวิธีการควบคุมปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลืองและแป้งสาลี

ศึกษาวิธีการควบคุมปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลืองและแป้งสาลี โดยการเติมเซลล์เจริญและสปอร์ลงในถั่วเหลืองและแป้งสาลี

3.1 ศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลือง

วิธีเตรียมเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

การเตรียม Stock เชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ 11778 ในอาหารเหลว TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วขีดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยว เลี้ยงในอาหารเหลว TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารแข็ง TSA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บหลอดอาหารแข็ง TSA ที่มีเชื้อ *B. cereus* ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (Jaquette and Beuchat, 1998)

1. เตรียมเซลล์เจริญของ *B. cereus* ถ่ายเชื้อจากหลอด Stock ลงในอาหารเหลว TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเหลว TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์เจริญประมาณ 7- 9 log CFU/ml (Young *et al.*,1995)

2. เตรียมสปอร์ของ *B. cereus* ถ่ายเชื้อจากหลอด Stock ลงในอาหารเหลว TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง NAMS บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 – 76 ชั่วโมง ขูดล้างสปอร์ที่บริเวณผิวหน้าอาหารด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจานละ 5 มิลลิลิตร เหวี่ยงแยกเซลล์และส่วนใสออกด้วยความเร็ว 2,600 X g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 5

องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 6,000 X g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วเก็บเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และต้มทำลายเซลล์เจริญที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ปริมาณสปอร์ประมาณ 6 log CFU/ml (Jaquette and Beuchat, 1998 ; Kallander *et al.*, 1995)

วิธีเติม *B. cereus* ในถั่วเหลือง นำถั่วเหลือง 200 กรัม แช่ในสารละลาย เชื้อ *B. cereus* ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เซลล์เจริญ 50 มิลลิลิตรและสปอร์ 50 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทถั่วเหลืองที่เปียกและมีเชื้อ *B. cereus* ลงบนตะแกรง วางถั่วเหลืองดังกล่าวใน laminar flow hood ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจวิเคราะห์พบว่า ถั่วเหลืองจะมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ จำนวน 7 และ 4 log CFU/g โดยประมาณ ตามลำดับ (Himathongkham *et al.*, 2001 ; Andrews *et al.*, 1995)

ศึกษาการควบคุมปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลืองดังนี้ คือ

3.1.1 วิธีล้างด้วยน้ำ นำถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* น้ำหนัก 100 กรัม ล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำสะอาด ใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองและน้ำ เท่ากับ 1 : 2 เป็นจำนวน 3 ครั้ง แช่ถั่วเหลืองในน้ำสะอาด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่ แล้วแช่ในน้ำสะอาดอีกครั้งหนึ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ชุดควบคุม) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ล้างถั่วเหลืองโดยใช้น้ำไหลผ่านด้วยอัตรา 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999)

3.1.2 วิธีใช้สารเคมี นำถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* น้ำหนัก 50 กรัม แช่ในสารละลาย detergent 3 ชนิด คือสารละลาย trisodium phosphate เข้มข้น ร้อยละ 5 และ 10 สารละลาย sodium hypochorite เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม และสารละลาย calcium hypochorite เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม และ surfactant จำนวน 2 ชนิด คือ สารละลาย tween 80 เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม และ สารละลาย

dialkyldimethylammonium chloride เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม ใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองและสารละลาย เท่ากับ 1 : 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999) เปรียบเทียบกับถั่วเหลืองแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.1.3 วิธีใช้ความร้อน นำถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* น้ำหนัก 100 กรัม ให้ความร้อน 2 วิธี คือ ต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที และนึ่งที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส โดยประมาณ เป็นเวลา 60 นาที สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999)

3.2 ศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลี

วิธีเตรียมแป้งสาลีให้มีเชื้อ *B. cereus* นำเซลล์เจริญปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ สปอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในแป้งสาลีน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน เมื่อตรวจวิเคราะห์พบว่าแป้งสาลีจะมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ 7 และ 5 log CFU/g โดยประมาณ ตามลำดับ

ศึกษาการควบคุมปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลีดังนี้ คือ ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ที่ระดับกำลังไฟฟ้า 500 750 และ 900 วัตต์ โดยใช้เวลา 9 และ15 นาที ใช้รังสีแกมมาปริมาณ 10 กิโลเกรย์ (สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ) เปรียบเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุมคือ คั่วที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999)

อย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999) ทุก 15 วันเป็นเวลา 2 เดือน

5. ศึกษาผลของวัตถุกันเสียและแบคเทอริโอซินต่อปริมาณ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวสำเร็จ

ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ปริมาณ 7 และ 5 log CFU/g โดยประมาณ ตามลำดับ

5.1 วิธีใช้วัตถุกันเสีย ใช้โซเดียมเบนโซเอท 5 ระดับความเข้มข้นคือ 200 400 600 800และ 1,000 พีพีเอ็ม และโปแตสเซียมซอร์เบท 5 ระดับความเข้มข้น คือ 200 400 600 800และ 1,000 พีพีเอ็ม เติมในผลิตภัณฑ์แล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999) ทุก 15 วันเป็นเวลา 2 เดือน

5.2 วิธีใช้ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11)

5.2.1 การผลิตแบคเทอริโอซิน โดยเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ตามสภาวะการสร้างแบคเทอริโอซินโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำนึ่งปลาทูน่าสูตรทดแทน MRS (Medium I) (ภาคผนวก ก) เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นโดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) เพาะเลี้ยงในอาหาร Medium I บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ่านโอนเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเหลว 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วสกัดแบคเทอริโอซิน ที่ได้ (Partial purification) โดยแยกเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นจึงนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 2 ระดับ คือ อิ่มตัวร้อยละ 40 และ 80 แล้วจึงแยกตะกอนโปรตีนโดยแยกเหวี่ยงที่

ระดับความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วนำไปกำจัดเกลือออกโดยการ ไดอะไลซิสด้วยถุงไดอะไลซิสขนาด 3,500 Da โดยแช่ถุงไดอะไลซิสในฟอสเฟอร์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีสัดส่วน คือ สารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลาย บัฟเฟอร์ 50 ส่วน และกวนบัฟเฟอร์ตลอดเวลา นำแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแต่ละส่วนในขั้นตอนการสกัดหากิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์เจริญและสปอร์ เป็นหน่วยของ Arbitary Unit (AU/ml)และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method (ภาคผนวก ข)

5.2.2 นำแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) เติมในผลิตภัณฑ์แล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างวิเคราะห์ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ด้วยวิธี surface spread plate method (A.O.A.C., 1999)