บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 โพรไบโอติก

โพรไบโอติกมาจากภาษากรีกแปลว่าเพื่อชีวิตและมีการนิยามความหมายต่างๆอีกในหลายปีที่ผ่านมา Lilly และ Stillwell ได้ใช้คำนี้ครั้งแรกในปี 1665 เพื่ออธิบายถึงจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีส่วนในการเสริมสร้างการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งซึ่งตรงข้ามกับคำว่า antibiotic หรือสารปฏิชีวนะ โดยเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ ซึ่งเป็นนิยามที่ได้รับการยอมรับและมีความชัดเจน (Fuller, 1992)

ภายหลัง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา หรือ USFDA (The United States Food and Drug Administration) ได้เปลี่ยนให้ใช้คำว่า DFM (Direct-Fed Microbial) แทนคำว่าโพรไบโอติก และได้ให้ความหมายว่าเป็นแหล่งของจุลินทรีย์มีชีวิตที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (Starvric and Kornegay, 1995)

EC-FLAIR (The European Community-Food Linked Agro Industrial Research Group) รายงานในปี 1993 ใช้คำว่า EHCP (Ecological Health Control Product) แทนโพรไบโอติก อย่างไรก็ตามคำจำกัดความที่ตั้งขึ้นมาใหม่นี้ไม่เป็นที่น่าสนใจ และคำว่าโพรไบโอติกก็ยังคงใช้กันอยู่ทั่วไป สำหรับใช้เรียกผลิตภัณฑ์ ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Stavric and Kornegay,1995)

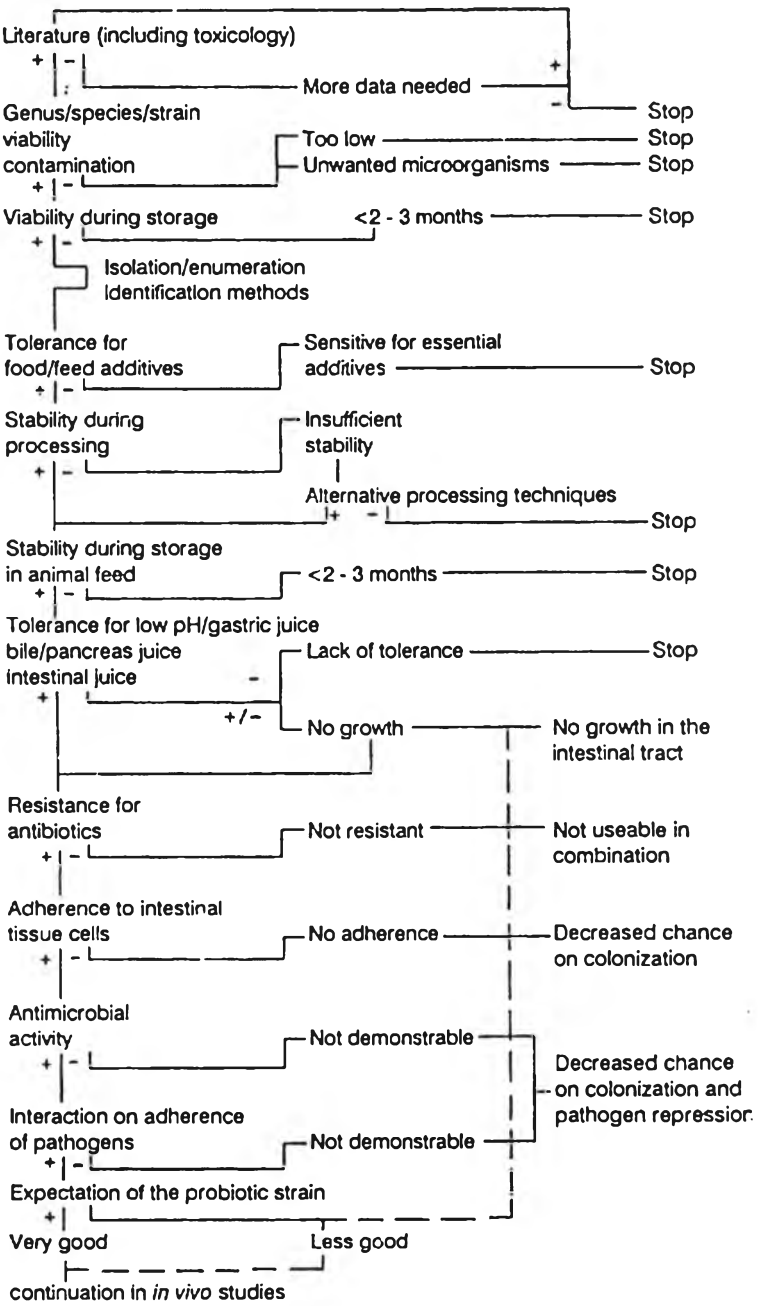
นอกจากนี้ USFDA และ AAFCO (The Association of American Feed Control Official) ได้จัดให้โพรไบโอติกเป็น Generally Recognized as Safe (GRAS) ingredients ซึ่งเป็นสารที่เติมลงในอาหารมนุษย์และสัตว์แล้วมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคโดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกรและนักพิษวิทยาแล้ว (Pollman, 1986)

2.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

จุลินทรีย์สายพันธุ์ใดจะเป็นโพรไบโอติกได้นั้น ต้องผ่านการคัดเลือกตามขั้นตอนดังรูปที่ 2.1 และสามารถสรุปคุณสมบัติได้ดังนี้ (Havenaar and Huis, 1992; Nousiainen and Setala, 1998 และ Karpela and Saxelin, 1999)

- ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกและเป็นที่ยอมรับแล้วว่ามีความปลอดภัยไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ
- ต้องมีความทนทาน ต่อสภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยที่กระเพาะ และทนน้ำดีที่ลำไส้เล็กภายในทางเดินอาหารได้
- เป็นเซลล์มีชีวิตและมีจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
- สามารถมีชีวิตและมีกิจกรรมของเซลล์ในระบบทางเดินอาหารได้
- สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะบริเวณเยื่อบุผนังทางเดินอาหารได้
- มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่บุกรุกหรือก่อให้เกิดโทษและสารที่สร้างขึ้นสามารถเพิ่มความด้านทานต่อภาวะการติดเชื้อภายในลำไส้ได้
- ไม่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
- ไม่ทำให้เกิดการแพ้
- มีความคงตัวและมีอัตราการรอดชีวิตสูงในสภาพการเก็บรักษาระยะเวลานาน
- เป็นสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 แผนผังสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก

ที่มา : Perdigon and Alvarez (1986)

2.3 ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

โดยปกติร่างกายของคนที่มีสุขภาพปกติจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดอาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในระบบทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร แบ่งออกเป็น 2 พวกคือ จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ซึ่งจะทำให้เกิดอาการท้องเสีย และจุลินทรีย์ไม่ก่อโรค (non-pathogen) ซึ่งเป็นชนิดที่มีประโยชน์ของร่างกายเนื่องจากจะไปควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีปริมาณมากจนทำให้เป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถแก่งแย่งและยึดติดกับผนังลำไส้ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆจึงทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถแก่งแย่งและยึดเกาะผนังลำไส้ได้ จึงถูกขับออกจากร่างกายในที่สุด (วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548)

การอยู่รวมกันระหว่างจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกาย ควรมีอัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างแบคทีเรีย 2 กลุ่มในอัตรา 15% ต่อ 85% หรือ 1:6 จึงจะทำให้ร่างกายอยู่ในสมดุลและมีสุขภาพดี (วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548) ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีดังนี้คือ

- รักษาสมดุลของปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากโพรไบโอติกสามารถสร้างสารบางชนิดได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่ให้มีปริมาณมาก นอกจากนี้ยังสามารถเข้ายึดเกาะเยื่อบุเซลล์ในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค (รุจา มาลัยพวง, 2544)

- ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแลคโตสทำให้ไม่เกิดอาหารท้องเสีย ในผู้ที่ไม่ได้ดื่มนมอย่างต่อเนื่องจะทำให้ร่างกายไม่สร้างเอนไซม์สำหรับย่อยแลคโตสเมื่อดื่มนม จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะย่อยแลคโตสทำให้เกิดแก๊สในระบบทางเดินอาหาร เกิดแรงดันและทำให้ลำไส้บีบตัว จึงเกิดอาการท้องเสีย แต่ในนมเปรี้ยวจะไม่มีแลคโตส เนื่องจากแลคโตสถูกย่อยเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกซึ่งมีประโยชน์คือช่วยให้ร่างกายดูดซึมแคลเซียมและวิตามินได้ดีขึ้น ส่งผลให้กระดูกและฟันแข็งแรง (วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548)

- ยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสารพิษหรือสารก่อมะเร็ง เมื่อเอนไซม์ของคนหรือสัตว์ย่อยสลายอาหารพวกโปรตีน จะเกิดสารพิษพวกเอมีนและฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งต่ออวัยวะต่างๆ ปะปนมาด้วย จากงานวิจัยหลายชิ้นยืนยันว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถดูดซึมสารพิษ เช่น ไนโตรซามีน นอกจากนี้ยังสามารถขจัดแหล่งของสารก่อมะเร็ง โดยการช่วยระบายกากอาหารออกจากลำไส้ ทำให้ลำไส้สัมผัสกับสารก่อมะเร็งได้น้อยลงหรือไม่ได้สัมผัสเลย เนื่องจากกากอาหารเคลื่อนผ่านไปในเวลาที่รวดเร็วกว่าเดิม (วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548)

- ช่วยสร้างและสังเคราะห์วิตามินที่มีความจำเป็น ให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติก สามารถสร้างและสังเคราะห์วิตามิน ไพริดอกซิน ไรโบ-ฟลาวิน ไทอามีนและกรดนิโคตินิค (รุจา มาลัยพวง, 2544)

- ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและลดอาการแพ้ งานวิจัยหลายเรื่องยืนยันว่าโพรไบโอติกช่วยรักษาโรคภูมิแพ้โดยลดการสร้าง proinflammatory cytokines ที่มีผลทำให้เกิดอาการแพ้บวมเฉพาะที่และบวมทั้งร่างกาย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในโพรไบโอติกไปกำจัด จุลินทรีย์ก่อโรคหรือ antigent ก่อนที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะเข้มแข็งและทำงานได้ (วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548)

- ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด จุลินทรีย์ในโพรไบโอติกสร้างสาร hydroxyl methyl glutarate เข้าสู่กระแสเลือดและสามารถไปยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้
(วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548)

- ปรับปรุงการบีบตัวของลำไส้ใหญ่ อาการท้องผูกทำให้ความถี่ของการบีบตัวของลำไส้ใหญ่ลดลง เมื่อดื่มนมที่เป็นโพรไบโอติกวันละ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน การขับถ่ายอุจจาระจะเป็นปกติ และอัตราการบีบตัวที่ลำไส้ใหญ่จะเพิ่มมากขึ้นเป็น 5-7 เท่า จากของเดิมที่ไม่ได้โพรไบโอติก ในทางกลับกันโพรไบโอติกยังสามารถป้องกันอาการท้องร่วงได้ด้วย
(วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548)

2.4 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกส่วนมากแล้วจัดอยู่ในกลุ่มแลคติค (lactic acid bacteria) หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติคเป็นสารหลักจากน้ำตาล แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคนี้ เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างยาก เนื่องจากมีความต้องการอาหาร เกลือแร่ กรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด โดยเฉพาะวิตามิน B complex เท่าที่ปรากฏในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มนี้ มักต้องเติมสารต่างๆ หลายชนิด เช่น yeast extract, skim milk, beef extract, peptone, malt extract, น้ำมะเขือเทศ ซึ่งแล้วแต่วัตถุประสงค์ในการใช้อาหาร เชื้อแต่ละชนิดต้องการวิตามินและ growth factor ค่อนข้างจำเพาะ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria จึงมีมากมายหลายสูตรด้วยกัน แต่ยังสรุปได้ไม่แน่นอนว่าอาหารชนิดใดเหมาะสมที่สุดในการใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ทุกชนิด นอกจากจะเพาะเลี้ยงยากแล้ว ยังเป็นแบคทีเรียที่ตายง่ายมาก ก่อให้เกิดปัญหาในการเก็บเชื้อในลักษณะเชื้อสดเป็นอย่างมาก น้ำมะพร้าวเป็นอาหารจากธรรมชาติและมีแร่ธาตุอาหารต่างๆ เช่น กรดอะมิโน วิตามินและน้ำตาลประกอบอยู่ในปริมาณพอสมควร (สายชล ชิวปรีชา, 2520) ได้มีผู้ทดลองใช้น้ำมะพร้าวแกงซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์หลายชนิด ปรากฏว่าได้ผลดี งานวิจัยของเพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์

(2524) รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus casei* ในอาหารน้ำมะพร้าวดัดแปลงสูตรเปรียบทียบกับอาหารเหลว MRS broth และ tomato broth (TM broth) ที่มีจำหน่ายทางการค้า พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวดัดแปลงสูตรเจริญได้ดีไม่แตกต่างกันกับที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth และเจริญได้ดีกว่าเชื้อที่เลี้ยงใน TM broth โดยองค์ประกอบในสูตรน้ำมะพร้าวนั้นประกอบด้วย โซเดียมอะซิเตท 0.5%, แอมโมเนียมซิเตรท 0.2%, peptone 1.0%, yeast extract 0.5% และ tween 80 0.1% ซึ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวดังกล่าวเจริญได้ดีกว่าสูตรที่ลดส่วนประกอบลงทีละอย่างจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะสร้างสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารหลักเนื่องจากเป็นอาหารที่มีราคาถูกและสามารถให้เซลล์ได้ในปริมาณสูง

ในน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตรจะมีองค์ประกอบดังนี้ มีน้ำตาลประมาณ 1.45 กรัม ซึ่งส่วนมากเป็นซูโครส มี ascorbic acid (vitamin C) อยู่ประมาณ 7-37 มิลลิกรัม วิตามิน B complex ประกอบด้วย nicotinic acid 64.0 ไมโครกรัม pantathonic acid 52.0 ไมโครกรัม biotin 2.0 ไมโครกรัม riboflavin 1.0 ไมโครกรัม และ folic acid 0.3 ไมโครกรัม (Vanderbelt, 1945) Steward, Caplin and Miller (1951) สกัดสารบางอย่างได้จากน้ำมะพร้าว ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่าโครงสร้างเป็น 1, 3-diphenylurea ซึ่งเป็นสารที่เร่งการเจริญชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีฮอร์โมน kinetin ซึ่งมีผลช่วยเร่งการแบ่งเซลล์

2.5 การเตรียมตัวอย่างเชื้อเพื่อทำแห้ง

เชื้อที่เก็บไว้เป็น stock culture ในลักษณะ freezing ถูกนำมากระตุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS หลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง exponential phase ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อกระตุ้นเชื้ออีกครั้ง แล้วจึงเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อให้มีจำนวนมากขึ้นใน fermenter โดยใช้สารละลายเหลว MRS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะสุญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิ อัตราการกวนของใบพัด ระดับ pH จนเชื้อเข้าสู่ช่วง stationary phase ตอนต้น (To and Etzel, 1997a และ Zayed and Roos, 2003) แล้วจึงทำให้เข้มข้นเป็น cell paste โดยการเหวี่ยงแยกเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Johnson and Etzel, 1995) cell paste ที่เตรียมได้ต้องใช้ภายในวันเดียวกันและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ (To and Etzel, 1997b) ก่อนการกระตุ้นเชื้อจากการเก็บในสภาพแช่แข็งอาจมีการตรวจสอบถึงคุณสมบัติต่างๆเช่น การติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase รูปร่าง เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ (Bozoglu and Gurakan, 1989) หลังจากได้ cell paste แล้วจะมีการเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยสารละลาย potassium phosphate buffer อีกครั้งหนึ่งเพื่อล้างเซลล์ (Abadius, *et al.*, 2001)

2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

การทำแห้งจุลินทรีย์ มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญเพื่อต้องการเก็บเชื้อให้มีชีวิตอยู่ได้นาน และมี metabolic activity สูงที่สุด ซึ่งในอุตสาหกรรมที่ใช้ส่วนใหญ่จะคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหรือการใช้ประโยชน์ในด้านนั้นๆ มาอย่างดีโดยวิธีการทางจุลชีววิทยา อย่างไรก็ตามการเก็บเชื้อในทางปฏิบัติเป็นการยากยิ่งที่จะเก็บรักษาเชื้อให้ดำรงอยู่ในสภาพ active ได้อย่างสมบูรณ์ การเก็บรักษาเชื้อมีทั้งในรูปเชื้อสดและเชื้อแห้ง ซึ่งวิธีการเก็บรักษามีหลักใหญ่เป็นพื้นฐานคือ การลด metabolic rate ของเชื้อลง (ภัทรียา จุฑามาศ, 2541)

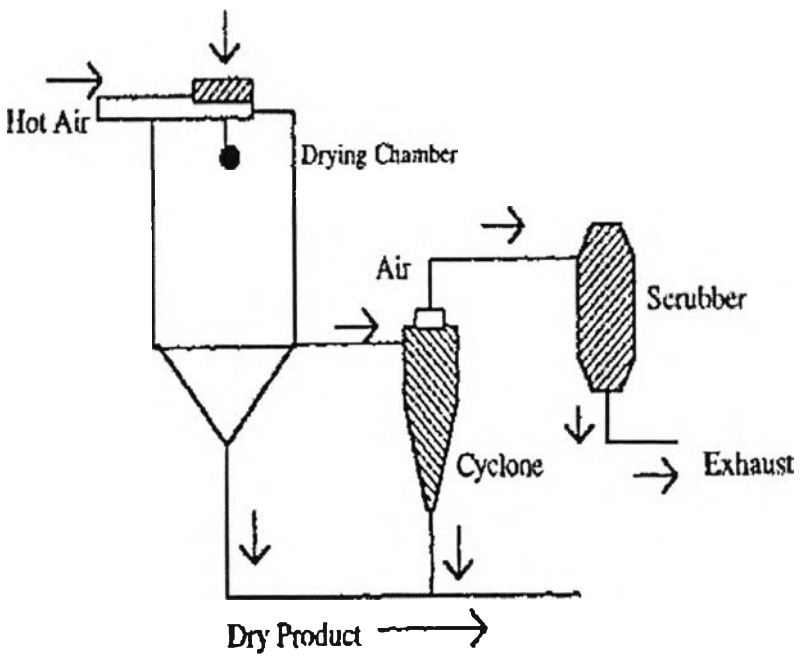
การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในรูปเชื้อสดนั้นสามารถยับยั้งกิจกรรมต่างๆเพื่อลด metabolic rate ได้โดยลดอุณหภูมิการเก็บรักษาให้ต่ำลงส่วนการเก็บรักษาในรูปเชื้อแห้งนั้นสามารถลด metabolic rate ได้โดยทำให้ available water ของเชื้ออยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะต่อการเจริญ การเก็บเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวนี้สามารถปรับปรุงวิธีการเก็บรักษาเชื้อโดยการเติมสารบางอย่างที่ป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับเชื้อ เช่น กลีเซอรอล น้ำตาล นมผงหรืออาจจะเป็นวัสดุอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีการเติมสารที่เป็นบัฟเฟอร์ เพื่อรักษาระดับ pH มิให้มีการเปลี่ยนแปลงมากเกินไป เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในรูปเชื้อแห้งนี้ในทางปฏิบัติมักนิยมใช้การทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจาย (spray drying) และวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) (Foster, 1962)

การเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์จะนำไปใช้ประโยชน์ ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม ที่จำเป็นต้องใช้เชื้อเป็นประจำ นิยมเก็บรักษาเชื้อในรูปเชื้อสด วิธีนี้จะมีการถ่ายเชื้ออยู่เสมอในระหว่างการเก็บ แต่หากต้องการเก็บเชื้อไว้ใช้ประโยชน์นานๆ โดยไม่มีการต่อเชื้อ มักจะใช้วิธีทำแห้งในรูปผง โดย วิธีพ่นกระจายหรือวิธีแช่เยือกแข็ง ทั้งยังเหมาะต่อการขนส่งไปยังที่ต่างๆ

2.6.1 การทำแห้งจุลินทรีย์แบบพ่นกระจาย (spray drying)

การทำแห้งแบบพ่นกระจายเป็นเทคโนโลยีที่มีอัตราการผลิตสูงแต่ค่าใช้จ่ายต่ำ ซึ่งรู้จักกันดีในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับทำแห้งและลดปริมาตรของอาหารให้น้อยลง รวมถึงการทำจุลินทรีย์ให้เข้มข้นขึ้นและช่วยยืดอายุการเก็บรักษา มีการใช้วิธีนี้เพื่อเตรียมเชื้อตั้งต้นหลายชนิดในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก อย่างไรก็ตามความร้อนและการสูญเสียน้ำจะมีผลโดยตรงต่อเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการรอดชีวิตภายหลังการทำแห้งจึงเป็นสิ่งที่ควรให้ความสนใจอย่างมาก (Lian, Hsiao and Chou, 2001)

การทำแห้งแบบพ่นกระจาย หมายถึง การแปลงของเหลวซึ่งอาจจะเป็นสารละลายหรือของเหลวข้น ให้เปลี่ยนสภาพเป็นผงแห้ง (Master, 1979) โดยมีการทำงานตามรูป 2.2 ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ดังนี้



รูปที่ 2.2 การทำงานของเครื่องทำแห้งแบบพ่นกระจาย
ที่มา : Thomas and Madigan (1991)

2.6.1.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อเพื่อทำแห้ง

ก่อนทำแห้งเชื้อนั้นต้องทำเซลล์ให้อยู่ในรูปของเหลวหรือ cell suspension ก่อน โดยผสมกับ carrier ซึ่งเป็นตัวกลางในการพาเชื้อเข้าสู่กระบวนการ เริ่มจากนำเซลล์อายุไม่เกิน 1 วัน ซึ่ง Fu and Etzel (1995) รายงานว่าเชื้ออายุ 1 วันนั้นยังมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตสูงสุด และจะลดลงตามเวลาที่นานขึ้น โดยเชื้อที่นำมาใช้นั้นต้องอยู่ในช่วง stationary phase ตอนต้น (Mauriellio, *et al*, 1998) แล้วผสมกับ carrier ให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนเข้าเครื่องทำแห้ง ซึ่งชนิดของ carrier นั้นอาจใช้ต่างกันไปได้แก่ นมพร่องไขมัน (skim milk) (Fu and Etzel, 1995; Mauriellio, *et al*., 1998 และ Gardiner, *et al*., 2002) นมปราศจากไขมัน (milk non fat) (Espina and Packard, 1979) maltodextrin (Johnson and Etzel, 1995) maltodextrin+lactose (To and Etzel, 1997a) skim milk+ascorbic acid หรือ monosodium glutamate (Teixeira, Castro and Kirby, 1995a) skim milk+sucrose (Mary, Moschetto and Tailliez,1993) skim milk+maltodextrin (Boza, Barbin and Scamparini, 2004) gum arabic, gelatin, soluble starch (Lian, *et al*., 2001) นอกจากสารละลายเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็น carrier แล้ว ยังทำหน้าที่เป็นสารปกป้องเซลล์ระหว่างการทำแห้งและสารละลายอาจถือได้ว่าเป็น feed solution ได้อีกด้วย (Meister, *et al*., 2000)

2.6.1.2 การทำแห้ง

เมื่อเตรียม feed solution ในขั้นตอนที่ 1 แล้ว จึงนำเข้าเครื่องทำแห้งมีลักษณะดังรูป 2.2 ลมร้อน (hot air) ที่ใช้ทำแห้งจะถูกทำให้ร้อนโดยเครื่องกำเนิดความร้อนส่งผ่านเข้าตัวถัง (drying chamber) ทางท่อลม อุณหภูมิลมเข้าสามารถกำหนดได้โดยตั้ง program การทำงานของเครื่องซึ่งเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิลมเข้าเอง ส่วนอุณหภูมิลมออกนั้นทำได้โดยปรับอัตราการไหลของ feed solution หากให้ feed solution มีอัตราเร็วเพิ่มขึ้นอุณหภูมิลมออกจะลดลงหรือหากลดอัตราเร็ว อุณหภูมิลมออกจะสูงขึ้น (Fu and Etzel, 1995) ตัวอย่างจะถูกดันผ่านหัว atomizer เพื่อลดขนาดให้เป็นละอองฝอย หัว atomizer นี้จึงเป็นส่วนสำคัญของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย การอัดฉีดอาจใช้วิธีการอัดความดันสูงไปที่หัวอัดฉีด เพื่อทำให้ของเหลวเคลื่อนที่ผ่านรูหัวฉีดซึ่งมีความเร็วสูง อาหารที่เป็นของเหลวจะต้องเป็นเนื้อเดียวกันและไม่มีอนุภาคใดไปอุดตันรูหัวฉีด หัวฉีดจะมีผลต่อลักษณะอนุภาคโดยทำให้อนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมและความเร็วรอบของการหมุนหัวฉีดจะมีผลต่อขนาดอนุภาค (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) นอกจากขนาดของอนุภาคจะขึ้นอยู่กับความเร็วรอบของหัวฉีดแล้วยังขึ้นกับแรงตึงผิวและความหนืดของตัวอย่างอีกด้วย (Elversson, 2005)

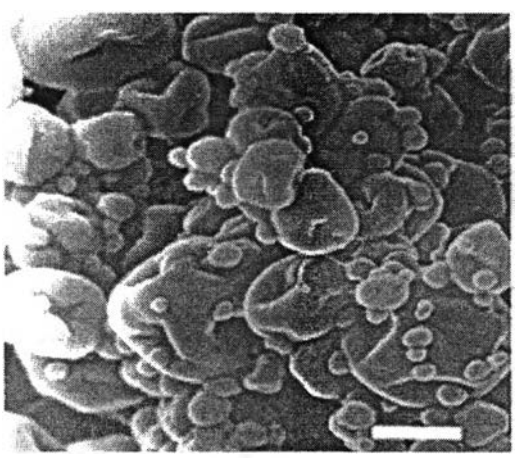
ละอองของ feed solution ซึ่งได้รับการอัดในขั้นตอนที่ 1 จะมีการสัมผัสกับลมร้อน เพื่อให้น้ำในอาหารรับเอาความร้อนจากลมร้อนจึงเกิดการระเหยน้ำออกไปการสัมผัสระหว่างละอองอาหารกับลมร้อน อาจทำได้โดยป้อนอาหารเหลวในทิศทางเดียวกันกับลมร้อนหรือทิศทางสวนกันก็ได้อนุภาคอาหารจะแขวนลอยในอากาศ เกิดการระเหยน้ำจนอาหารแห้งเป็นผง (พิมพรรณ รัตนพฤกษานนท์, 2526)

2.6.1.3 **การระเหยน้ำ**

เมื่อ feed solution ถูกพ่นเป็นละอองฝอยแล้ว อุณหภูมิที่ผิวหน้าของหยดจะสูงขึ้น น้ำที่บริเวณผิวหน้าจะค่อยๆระเหย ไอน้ำจะแพร่ผ่านอากาศและถูกพาไปโดยลมร้อน ความดันไอที่ผิวหน้าของหยดจึงต่ำกว่าความดันไอด้านในเป็นผลให้เกิดความแตกต่างของความดันไอขึ้น น้ำด้านในจึงเคลื่อนที่ออกมาด้วยอัตราเร็วเท่ากับน้ำที่ระเหยออกจากผิวหน้าโดยแรงคาปิลลารี เมื่อความชื้นของหยดลดลงอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำจากภายในอาหารมายังผิวหน้าจะต่ำกว่าอัตราการระเหยของน้ำไปยังอากาศโดยรอบ ผิวหน้าจึงแห้ง (วิไล รังสาดทอง, 2543)

2.6.1.4 **การแยกอาหารผงจากภาชนะทำแห้ง**

หลังจากตัวอย่างผงตกลงสู่เบื้องล่างของภาชนะทำแห้ง ผงที่น้ำหนักเบาจะถูกดูดโดยแรงจากพัดลมและส่งออกทางท่อลมออก (exhaust) ผงตัวอย่างสามารถแยกออกจากลมร้อนได้โดยอาศัยระบบไซโคลน (cyclone) ให้ตกกระทบกับผนังท่อไซโคลนและตกลงในภาชนะที่รองรับ (Fu and Etzel, 1995) อนุภาคของผงหลังทำแห้งนั้นมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างลักษณะของผงอนุภาคหลังทำแห้งแบบพ่นกระจาย (spray drying)
ที่มา : Gardiner, *et al.* (2002)

2.6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียจากการทำแห้งแบบพ่นกระจาย

ถึงแม้ว่าวิธีการทำแห้งแบบพ่นกระจายจะเป็นวิธีหนึ่งที่มีความน่าสนใจ และเป็นที่นิยมในการผลิตเชื้อผง เนื่องจากสามารถผลิตได้ต่อเนื่องไม่จำกัดปริมาณ สามารถดัดแปลงให้เป็นรูปแบบอัตโนมัติเต็มรูปแบบได้ ประยุกต์ใช้ได้กับผลิตภัณฑ์หลายชนิด ผลิตได้ในปริมาณมากแต่ค่าใช้จ่ายในแต่ละครั้งต่ำ แต่ระหว่างกระบวนการผลิตนั้น เชื้อยังมีโอกาสสูญเสียอันเนื่องมาจากการถูกทำลายด้วยความร้อนอยู่มาก (Kim and Bhowmik, 1990; Boza, *et al.*, 2004) ดังนั้นระหว่างกระบวนการทำแห้งนั้นจึงมีข้อคำนึงถึงเพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและเหลือเชื้อรอดชีวิตหลังกระบวนการอยู่มากที่สุดดังต่อไปนี้คือ

2.6.2.1 อายุของเชื้อก่อนทำแห้ง

จุลินทรีย์ที่มีระยะการเจริญ (growth phase) ต่างกันมีอัตราการรอดชีวิตต่างกันเมื่อใช้การทำแห้งแบบพ่นกระจายโดย Teixeira, *et al.* (1995b) ได้รายงานว่า *L. bulgaricus* ที่มีอายุในช่วง stationary phase เมื่อทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นกระจายโดยใช้ลมเข้า 200°C ลมออก 80°C และใช้ skim milk 11% เป็นสารปกป้องเซลล์แล้วเชื้อมีจำนวนลดลง 1 log ในขณะที่เชื้อที่อยู่ในช่วง exponential phase ลดลงถึง 3 log

2.6.2.2 จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้ง

จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนการทำแห้งที่ไม่เท่ากันส่งผลให้เชื้อรอดชีวิตหลังทำแห้งต่างกันด้วย Fu and Etzel (1995) ได้รายงานว่า หากจำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้งมีปริมาณมาก เมื่อผ่านการทำแห้งแล้วจะมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตสูงกว่าสารละลายที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นต่ำ

2.6.2.3 อุณหภูมิลมเข้าและอุณหภูมิลมออกขณะทำแห้ง

อุณหภูมิลมเข้าและอุณหภูมิลมออกของเครื่องทำแห้งแบบพ่นกระจายมีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยพบว่า อุณหภูมิลมเข้าและอุณหภูมิลมออกที่สูง จะส่งผลให้การรอดชีวิตของเชื้อลดลงเนื่องจาก ความร้อนจะทำให้เซลล์เสียหาย (cell damage) ดังงานวิจัยของ Espina and Packard (1979) ที่ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* ระหว่างทำแห้ง โดยใช้ Milk Non Fat (MNF) เป็นสารปกป้องเซลล์ ลมเข้า 170°C และแปรอุณหภูมิลม

ออกเป็น 75°C 80°C 85°C พบว่ามีค่า log reduction of viable cells ซึ่งใช้บ่งบอกการเสียชีวิตเท่า 1.43 2.29 และ 2.59 ตามลำดับ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิลมออกที่เพิ่มขึ้น หลังจากนั้น Fu and Etzel (1995) ศึกษาถึงอุณหภูมิลมออก 5 ระดับคือ 77°C 90°C 100°C 110°C และ 120°C ต่อการรอดชีวิตของ *L. lactis* ssp. *lactis* C2 ใน skim milk พบว่าการรอดชีวิตจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิลมออกสูงขึ้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 53 40 26 10 และ 1.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ To and Etzel (1997a) ได้ศึกษาการทำแห้ง *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) พบว่าการรอดชีวิตมีแนวโน้มลดลงเป็นเส้นตรงเมื่ออุณหภูมิลมออกเพิ่มขึ้น โดยที่ 90°C เชื้อรอดชีวิตเพียงแค่ 6% ในขณะที่ 60°C เชื้อรอดชีวิตสูงเกือบ 90% ในขณะเดียวกัน To and Etzel (1997b) ศึกษาความสามารถในการสร้างกรดแลคติคของ *L. pseudoplantarum* ภายหลังทำแห้งอีก พบว่าที่อุณหภูมิลมออก 90°C เชื้อต้องใช้เวลาถึง 28 ชั่วโมง เพื่อผลิตกรดแลคติกให้ได้ pH 5 ส่วนที่ลมออก 65°C เชื้อใช้เวลาเพียง 24.2 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าที่ 90°C Gardiner, *et al.* (2000) แสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิลมออกสูงขึ้น ความชื้นลดลงและการรอดชีวิตก็ลดลงเช่นกัน และถึงแม้เชื้อต่างชนิดกันหรือสารปกป้องเซลล์ต่างชนิดกันได้แก่ gelatin, gum, arabic, skim milk, soluble starch ก็ให้ผลไปในทางเดียวกันคือเชื้อรอดชีวิตลดลงเมื่ออุณหภูมิลมออกสูงขึ้น (Lian, *et al.*, 2001) สำหรับอุณหภูมิลมเข้านั้นมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อเช่นกันคือ เมื่ออุณหภูมิลมเข้าสูงขึ้นการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลงเช่นกันกับผลของอุณหภูมิลมออกแต่จะมีอิทธิพลน้อยกว่าอุณหภูมิลมออก (Kim and Bhowmik, 1990)

2.6.2.4 ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์

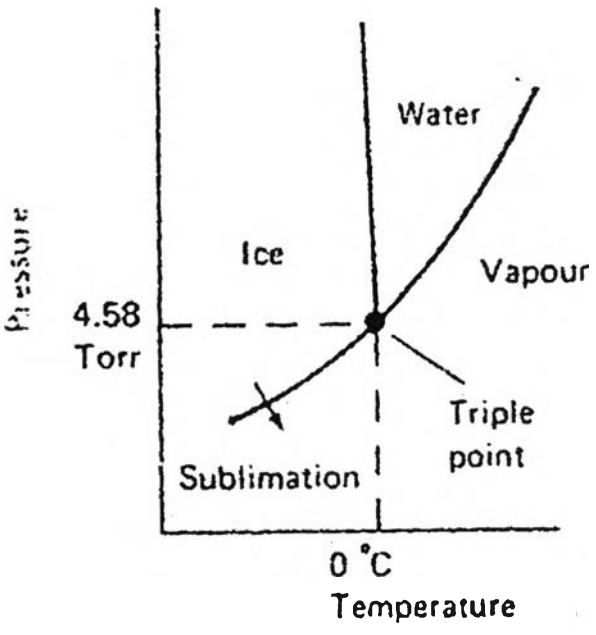
สารปกป้องเซลล์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลให้ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสความร้อนแตกต่างกัน ซึ่ง Espina and Packard (1979) ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของ MNF 2 ระดับ คือ 25% และ 40% ต่อการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* อุณหภูมิลมเข้า 170°C อุณหภูมิลมออก 75°C 80°C และ 85°C พบว่าที่อุณหภูมิลมออกระดับเดียวกันคือที่ 75°C การรอดชีวิตของเชื้อเมื่อใช้ MNF 25% เท่ากับ 8.2% สูงกว่า MNF 40 % ซึ่งเท่ากับ 3.71 % ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก เมื่อให้ความเร็วรอบและขนาดของ atomizer เท่ากัน ที่ความเข้มข้นระดับสูงจะให้อนุภาคมีขนาดโตกว่า การที่อนุภาคมีขนาดโตกว่านี้เองส่งผลให้เชื้อถูกทำลายด้วยความร้อนสูงกว่าอนุภาคขนาดเล็ก ด้วยกลไกการกักเก็บความร้อนไว้ภายในอนุภาคของสารปกป้องเซลล์นี้เองทำให้ความร้อนเข้าทำลายเซลล์ได้ ฉะนั้นหากอนุภาคมีขนาดใหญ่ ระยะเวลาที่น้ำระเหยออกนอกอนุภาคนานกว่าอนุภาคขนาดเล็ก เชื้อจึงสัมผัสกับความร้อนนานกว่าส่งผลให้การรอดชีวิตต่ำกว่านั่นเอง

2.6.2.5 ชนิดของสารปกป้องเซลล์

สารปกป้องเซลล์ของเชื้อที่ใช้เตรียม feed solution นอกจากเป็นตัวช่วยนำเชื้อเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแล้ว ความแตกต่างของชนิดที่ใช้ยังมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อด้วย ยกตัวอย่าง carrier เช่น skim milk, gum arabic, gelatin และ soluble starch พบว่า skim milk จะทำให้ *Bifidobacterium longum* รอดชีวิตได้สูงสุดเท่ากับ 82.59% รองลงมาคือ gelatin รอดชีวิตเท่ากับ 63.74% gum arabic และ soluble starch รอดชีวิตเท่ากับ 41.16% และ 29.06% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 95% (Lian, *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการใช้สาร 2 ชนิดเป็น carrier ร่วมกันได้แก่ skim milk+sucrose (Mary, *et al.*, 1993) หรือน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยพบว่าสารทั้งหมดนี้นอกจากทำหน้าที่เป็น carrier แล้ว ยังช่วยเสริมให้เชื้อรอดชีวิตมากขึ้นด้วย แต่ยังไม่มีการอธิบายถึงกลไกการทำหน้าที่ไว้อย่างชัดเจน (Meister, *et al.*, 2000)

2.6.3 การทำแห้งจุลินทรีย์แบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นกระบวนการเอาน้ำออกจากอาหารในสภาวะที่น้ำเป็นของแข็ง (น้ำแข็ง) นั่นคือเกิดกระบวนการระเหิด (sublimation) ขึ้น การระเหิดคือ การนำน้ำออกจากตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งในสภาวะก๊าซโดยไม่ผ่านสภาวะที่เป็นของเหลว (Simone and Brown, 1991) เมื่อความดันไอและอุณหภูมิที่ผิวหน้าน้ำแข็งมีค่าต่ำกว่าจุดวัฏภาคของก๊าซของเหลว และของแข็งอยู่ในสภาวะสมดุล (จุดทริเปิล คือ 4.58 ทอร์ และ 0°C) (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) ความสัมพันธ์ระหว่างความดันไอของน้ำแข็งและอุณหภูมิของน้ำแข็งที่ต่ำกว่าจุดทริเปิล (Triple point) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 phase diagram **ของน้ำ**

ที่มา : Oetjen and Haseley (2004)

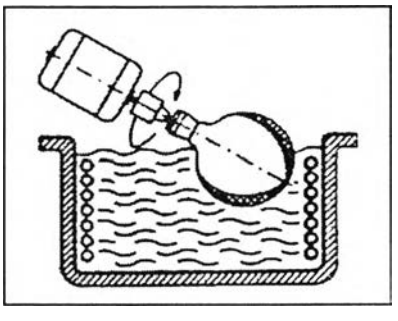
2.6.3.1 **การเตรียมตัวอย่างเชื้อเพื่อทำแห้ง**

หลังจากได้ cell paste จากการเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวน ซึ่งมีอายุอยู่ในช่วง stationary phase ตอนต้นแล้ว จึงนำมาผสมกับสารบางชนิดเพื่อช่วยเป็นสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ sucrose, trehalose, skim milk, trehalose+skim milk และ sucrose+trehalose (Zayed and Roos, 2004) หรือใช้ lactose และ sucrose เป็นสารปกป้องเซลล์ (Vasilijevic and Jelen, 2003) นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำตาล lactose, sucrose ร่วมกับ skim milk เป็นสารปกป้องเซลล์นั้นอีกด้วย (Abadius, *et al.*, 2001) เมื่อนำเซลล์ผสมกับสารปกป้องเซลล์แล้ว จึงทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนแช่แข็งเบื้องต้นและเข้าเครื่องทำแห้ง (Lian, *et al.*, 2001)

2.6.3.2 **การแช่แข็งเบื้องต้น**

กระบวนการแช่แข็งสารละลายเบื้องต้นทำได้โดย การทำให้เกิดแผ่นฟิล์มบางๆจากการหมุนขวดหรือภาชนะอย่างช้าๆในภาชนะที่บรรจุสารลดอุณหภูมิ (Champangne, *et al.*, 1991) ดังรูปที่ 2.5 สารลดอุณหภูมิจะลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบ

เซลล์และภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2535) การแช่แข็งเบื้องต้นนั้นมีจุดประสงค์ให้ตัวอย่างนั้นมีสภาพเป็นของแข็งโดยการใช้ความเย็นก่อนทำแห้ง สิ่งที่สำคัญคือ วิธีการในการแช่แข็งและอุณหภูมิสุดท้ายของตัวอย่างที่ทำการแช่แข็งซึ่งจะมีผลต่อความสามารถการทำแช่แข็งแห้ง ตัวอย่างที่นำมาผ่านกระบวนการซึ่งอยู่ในสถานะที่เป็นของเหลวจะถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วและเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก ลักษณะของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากขนาดและรูปร่างของผลึกน้ำแข็งนั้นมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อหรือคุณภาพของตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็ง (รุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต, 2535)



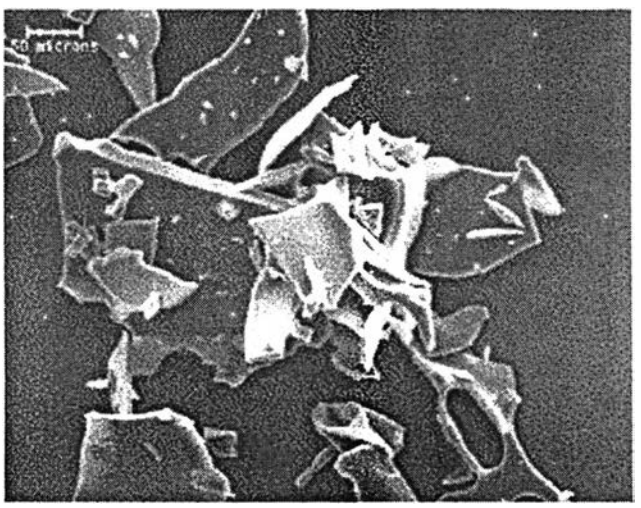
รูปที่ 2.5 การหมุนขวดในสารลดอุณหภูมิเพื่อทำให้เกิดแผ่นฟิล์มบางๆ ในการแช่แข็งเบื้องต้นก่อนทำแห้ง

ที่มา : Oetjen and Haseley (2004)

2.6.3.3 การทำแห้ง

น้ำที่จะระเหิดไปจากผิวหน้าของน้ำแข็งได้จะต้องใช้พลังงานที่จะทำให้เกิดการระเหิด พลังงานที่ใช้จะมีค่าเท่ากับพลังงานความร้อนแฝงของการระเหิดของน้ำ เมื่อเป็นเช่นนี้กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงเกี่ยวข้องกับหลักการถ่ายเทความร้อนและการถ่ายเทมวล (Karel, 1975) เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งจะถ่ายเทความร้อนจากผิวหน้าของตัวอย่างผ่านชั้นของผลิตภัณฑ์ไปยังบริเวณเกิดการระเหิด (King, 1973) ไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดถูกถ่ายเทไปยังผิวหน้าของตัวอย่างและถูกส่งผ่านไปยังเครื่องควบแน่น หากไอน้ำไม่ถูกส่งออกไปแล้ว ความดันไอจะสูงขึ้นและอุณหภูมิที่บริเวณส่วนหน้าของการระเหิดก็จะสูงขึ้นด้วย ทำให้เกิดการหลอมเหลวของตัวอย่าง เมื่อไอน้ำถูกส่งออกไปแล้ว ตัวอย่างจะแห้งและมีความคงตัวจนสามารถนำออกจากเครื่องทำแห้งได้ (Lorentzen, 1981)

โครงสร้างของตัวอย่างระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งเกิดจาก ขั้นตอนการแช่แข็งและการทำแห้ง ซึ่งการแช่แข็งทำให้สารละลายแยกออกเป็นของผสม 2 ส่วนคือ ส่วนของผลึกน้ำแข็งและส่วนของสารละลายเข้มข้น คุณสมบัติของสารละลายเข้มข้นนี้ขึ้นกับอุณหภูมิ ความเข้มข้น และองค์ประกอบ ถ้าการทำแห้งทำที่อุณหภูมิต่ำ สภาพการเคลื่อนที่ของสารละลายเข้มข้นสูงๆ จะเกิดขึ้นช้ามากจนไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นในระหว่างการทำแห้ง จากผลดังกล่าวโครงสร้างที่ได้จึงประกอบด้วยรู ซึ่งเป็นบริเวณที่ผลึกน้ำแข็งเคยอยู่นั่นเอง ในทางตรงกันข้าม ถ้าอุณหภูมิการทำแห้งสูงกว่าระดับวิกฤต สภาพการเคลื่อนที่ของสารละลายเข้มข้นอาจจะสูงเพียงพอที่จะทำให้เกิดการไหลและสูญเสียโครงสร้างเดิม โดยทั่วไปจะพบว่าการแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็วจะให้ผลึกขนาดเล็กและอัตราการทำแห้งจะช้ากว่าตัวอย่างที่ได้จากการแช่เยือกแข็งแบบช้า อย่างไรก็ดี ผลกระทบที่มีต่อปัจจัยคุณภาพ เช่น สี และการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์อาจจะปรับปรุงให้ดีขึ้นได้โดยการแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็ว (Karel, 1975) ตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีลักษณะดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ลักษณะของตัวอย่าหลังผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ที่มา : Haque and Roos (2004)

2.6.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ถึงแม้วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังทำแห้งน้อยที่สุด รวมถึงมีการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงด้วย แต่ยังมีปัจจัยบางประการที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อระหว่างการทำแห้งด้วยเช่นกัน ดังนี้

2.6.4.1 อายุของเชื้อก่อนทำแห้ง

เซลล์จุลินทรีย์ที่มีอายุอยู่ในช่วง stationary phase จะมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าเพราะเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างสมบูรณ์ Foster (1962) ได้รายงานถึงวิธีการที่จะเก็บแบคทีเรียแลคติกและยังคงกิจกรรมที่สูงไว้ โดยการเลี้ยงเชื้อให้เจริญอยู่ในช่วงหลังของ log phase หรือช่วงต้นของ stationary phase ก่อนทำการแช่แข็ง Heckly (1978) รายงานว่า เชื้อที่เจริญเต็มที่ที่ 24 ชั่วโมง จะมีชีวิตรอดมากกว่าเชื้อที่เจริญที่ 3-7 ชั่วโมง ซึ่งไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง

2.6.4.2 ความเข้มข้นของเซลล์ก่อนทำแห้ง

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของเซลล์นั้นมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตโดยที่อัตราการรอดชีวิตจะมีสูงขึ้นเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการทำแห้งสูงขึ้น Kilara, *et al.* (1976) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นนั้นมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อเช่นกัน โดยที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *L. bulgaricus* เป็น $6x10^5$ CFU/mL และ $7x10^4$ CFU/mL เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้ง มีการรอดชีวิตเท่ากับ 75% และ 10% ตามลำดับ นอกจากนี้ *L. acidophilus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1.6x10^5$ CFU/mL และ $2.6x10^4$ CFU/mL เมื่อผ่านการทำแห้งจะมีการรอดชีวิตเท่ากับ 63 % และ 19 % ตามลำดับ และ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $7.3x10^5$ CFU/mL และ $2.5x10^4$ CFU/mL เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งจะมีการรอดชีวิตเท่ากับ 11% และน้อยกว่า 1% ตามลำดับ

2.6.4.3 การแช่แข็งเบื้องต้น

การแช่แข็งเบื้องต้นมีจุดประสงค์ให้ตัวอย่างมีสภาพเป็นของแข็งโดยใช้ความเย็น เชื้อที่นำมาผ่านกระบวนการที่อยู่ในสภาพของเหลวจะถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก ถ้าผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กมากๆ จะทำให้การทำแห้งทำได้ยาก แต่

การทำอันตรายต่อเซลล์นั้นจะมีผลน้อยที่สุด ในขณะที่การให้ความเย็นในอัตราที่ช้าจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่ใหญ่ เมื่อน้ำถูกระเหิดออกจากตัวอย่างทำให้เกิดโพรงหรือช่องว่างที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการคงสภาพของตัวอย่างหรือเชื้อมีชีวิตลดลง (Goldblith, Ray and Rothmary, 1975) Abadias, *et al.* (2000) ทดลองแช่แข็งแบบเร็วและช้า พบว่าการแช่แข็งแบบเร็วที่ -20°C เชื้อรอดชีวิตหลังทำแห้ง 28.9% และการทำแห้งแบบช้า -12°C เชื้อมีการรอดชีวิตแค่ 19.3% แต่การแช่แข็งอย่างเร็วเกินไปทำให้การเกิดผลึกภายในเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ช้ากว่า ส่งผลให้ความเข้มข้นภายนอกเซลล์สูงกว่าจึงเกิดแรงดันออสโมติก น้ำภายในเซลล์จึงออกสู่ภายนอกเซลล์เพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติกที่เกิดขึ้น (Simione and Brown, 1991)

2.6.4.4 ชนิดของสารปกป้องเซลล์

L. salivarius ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในน้ำกลั่น โดยปราศจากสารปกป้องเซลล์ พบว่าเชื้อมีการรอดชีวิตลดลง 99% แต่เมื่อมีสารปกป้องเซลล์ได้แก่ sucrose, trehalose, skim milk, sucrose+skim milk, trehalose+skim milk, sucrose+trehalose หรือ sucrose+trehalose+skim milk แล้วนั้นการรอดชีวิตจะสูงขึ้นโดยที่ sucrose 4%+trehalose 4%+skim milk 18% สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ sucrose 4%+trehalose 4%, trehalose 4%+skim milk 18%, sucrose 4%+skim milk 18%, trehalose 4%, skim milk 18% และ sucrose 4% ตามลำดับ (Zayed and Roos, 2004) หรือหากวัดค่า β-galactocidase activity retension ของ *L. bulgaricus* เมื่อใช้ lactose 5%, lactose 10%, sucrose 5%, sucrose 10% เป็นสารปกป้องเซลล์พบว่า enzyme activity retension ของเชื้อที่มี lactose 10% และ sucrose 10% ให้ผลเท่าเทียมกันและสูงกว่าการใช้ที่ระดับ 5% ของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด (Vasilijevic and Jelen, 2003) และการใช้น้ำตาล lactose, sucrose ร่วมกับ skim milk เป็นสารปกป้องเซลล์นั้นจะให้ การรอดชีวิตสูงกว่าการใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว ซึ่งอัตราส่วนระหว่าง skim milk กับน้ำตาลคือ skim milk 10%+lactose 10%, skim milk 10%+sucrose 10% (Abadius, *et al.*, 2001) หลังทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง *Bacillus linens* แล้วพบว่ามีการรอดชีวิตสูงถึง 100% และแบคทีเรียแลคติคที่ทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็งนั้นสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีกว่าการทำแห้งแบบพ่นกระจาย (To and Etzel, 1997a และ To and Etzel, 1997b)

อย่างไรก็ตามการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งทางการค้านั้น ยังจำกัดอยู่ในบางผลิตภัณฑ์ เพราะถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีคุณภาพสูง แต่ก็มีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงกว่าวิธีการทำแห้งอื่นๆ กระบวนการทำแห้งทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นต้องการเครื่องมือที่พิเศษ ใช้

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พลังงานมากและใช้เวลาในการทำแห้งนาน ซึ่งต้องใช้เวลานานถึง 12–30 ชั่วโมงในการแห้งเพื่อให้ได้ความชื้นของผลิตภัณฑ์เหลือร้อยละ 2 (พรเทพ เมฆารักษ์ภิญโญ, 2538)

2.6.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งระหว่างการเก็บรักษา

2.6.5.1 อุณหภูมิการเก็บรักษา

นอกจากปัจจัยขณะทำแห้งที่เหมาะสมจะมีส่วนเพิ่มอัตราการรอดชีวิตแล้ว อุณหภูมิการเก็บรักษาที่เหมาะสมก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยยืดอายุของเชื้อให้มีชีวิตนานขึ้น ดังงานของ Teixeira, *et al.*, (1995a) ซึ่งสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการรอดชีวิตของเชื้อเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C 8°C 15°C และ 20°C กับระยะเวลาการเก็บรักษาพบว่า เมื่อเวลานานขึ้น ยิ่งอุณหภูมิการเก็บรักษาสูง ความชันของกราฟมีแนวโน้มลดลงสูงซึ่งหมายความว่าอัตราการตายของเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกันกับเชื้อทุกชนิด (Gardiner, *et al.*, 2000) และการรอดชีวิตจะยิ่งลดลงอีกหากมีความชื้นสัมพัทธ์ขณะเก็บรักษาสูงขึ้น (Mary, *et al.*, 1993)

2.6.5.2 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้เก็บรักษา

บรรจุภัณฑ์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของเชื้อ โดยบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆได้แก่ laminated pouch ประกอบด้วยชั้น nylon/aluminium/PP ขวดแก้วและขวด PET เก็บรักษา *B longum* ผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นกระจายแล้วที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าเชื้อที่เก็บรักษาใน laminated pouch มีการรอดชีวิตสูงสุดแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับขวดแก้วแต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับขวด PET ซึ่งจะมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตต่ำสุด (Wang, Yu and Chou, 2004)