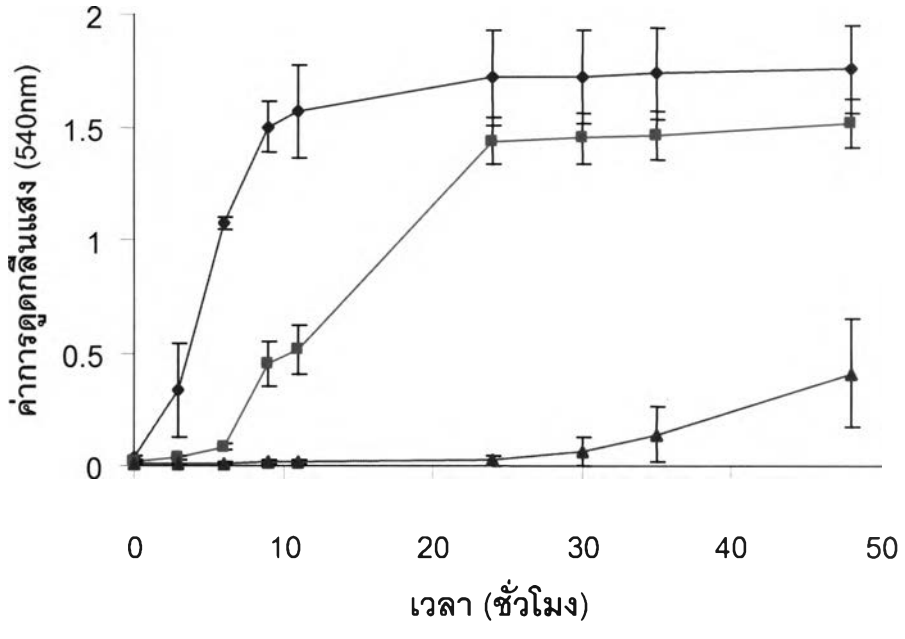
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การเจริญของเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าว

ผลการนำเชื้อ *L. gasseri, L. johnsonii* และ *L. salivarius* มาเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าว บ่มที่ 37°C แล้วมาวัดการเจริญพบว่า *L. gasseri* เจริญได้ดีที่สุดดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 การเจริญของ *L. gasseri* (◆) *L. johnsonii* (■) *L. salivarius* (▲) เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวและบ่มที่ 37°C

จากรูปที่ 4.1 *L. gasseri* เจริญเข้าสู่ช่วง exponential phase ได้เร็วที่สุด มีความชันสูงสุดพร้อมทั้งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และเข้าสู่ช่วง stationary phase ได้เร็วที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ส่วน *L. johnsonii* นั้น เข้าสู่ช่วง stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 24 สุดท้าย *L. salivarius* เจริญได้ช้าที่สุด โดยชั่วโมงที่ 50 เชื้อยังไม่เข้าสู่ช่วง stationary phase รวมถึงมีระยะ lag phase นานที่สุดและกราฟช่วง exponential phase มีความชันน้อยที่สุดซึ่งการเจริญของ *L. gasseri* กับ *L. johnsonii* นั้น สอดคล้องกับในงานวิจัยของ Avonts, Uytven and Vuyst (2004) ที่รายงานว่า *L. gasseri* และ *L. johnsonii* ที่เลี้ยงในอาหาร MRS เชื้อเจริญเข้าช่วง stationary phase ประมาณชั่วโมงที่ 14-20 และ 20-25 ตามลำดับ แต่สำหรับ *L. salivarius* นั้นแตกต่างกับในงานวิจัยของ (Kelly, *et al.*, 2005) ที่เลี้ยง *L. salivarius* ในอาหาร MRS แล้ว เชื้อเจริญเข้าช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 เร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าว (สูตร

อาหารแสดงในภาคผนวก ข ข้อ 2) ซึ่งเป็นไปได้ว่า *L. salivarius* นั้นมีความต้องการสารอาหารจำพวกไนโตรเจนและวิตามิน B มากกว่าเชื้อชนิดอื่น ซึ่งในอาหาร MRS นั้นมีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าอาหารน้ำมะพร้าว ทำให้ *L. salivarius* ที่เลี้ยงใน MRS นั้นเจริญได้ดีกว่า Thomas (1991) ได้อธิบายว่า เชื้อที่มีระยะ lag phase สั้น ระยะ exponential phase มีความชันสูง และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงนั้น หมายความว่าเชื้อชนิดนั้นสามารถเจริญได้ดีและสามารถผลิตเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นหากพิจารณาจากความสามารถในการเจริญซึ่งเป็นหนึ่งในคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ต้องมีการเจริญได้ดี พบว่า *L. gasseri* นั้น มีคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ประหยัดเวลาในการผลิตเซลล์และให้เซลล์ได้ในปริมาณมากเพียงพอเมื่อนำไปใช้ จึงเลือก *L. gasseri* มาผลิตเป็นไพรไบโอติกผงในขั้นตอนต่อไป

4.2 การทำแห้งเชื้อโพรไบโอติกแบบพ่นกระจาย

4.2.1 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อการรอดชีวิตของเชื้อผงหลังทำแห้ง

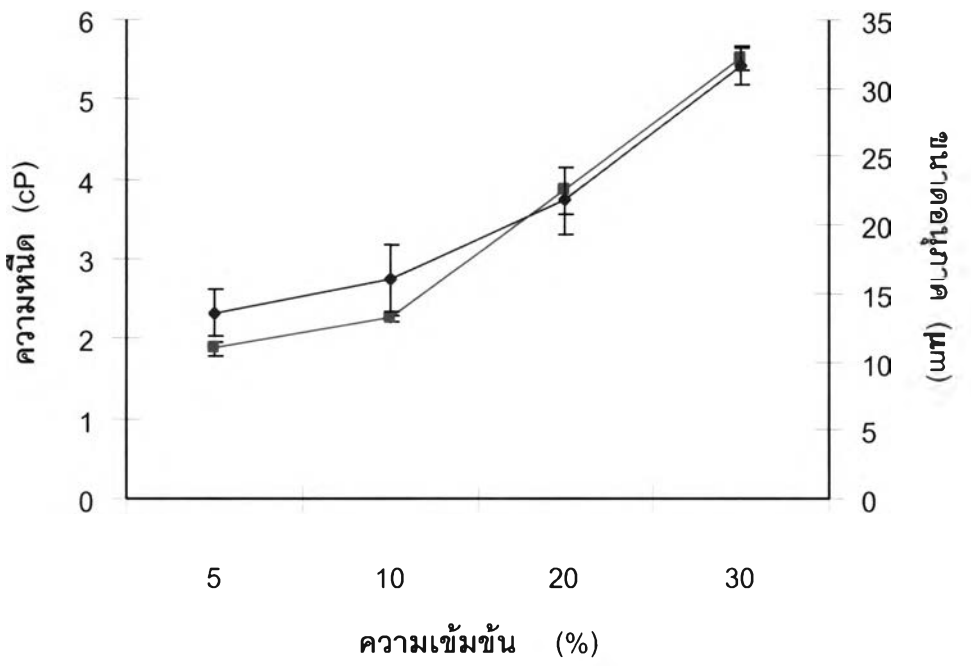
เชื้อที่ถูกทำแห้งแบบพ่นกระจายโดยมีสารละลาย MNF ความเข้มข้น 5 % 10 % 20 % และ 30 % (w/v) เป็นสารปกป้องเซลล์นั้นพบว่า มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตลดลง แสดงดังตารางที่ 4.1 (วิธีคิดจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตนั้นแสดงไว้ในภาคผนวก ก ข้อ 2) ซึ่งสารละลาย MNF เข้มข้น 5 % ทำให้เชื้อมีการรอดชีวิตสูงสุดและมีแนวโน้มลดลงเมื่อ MNF มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อการรอดชีวิตของเชื้อผง

ความเข้มข้นของสารละลาย MNF (%)	การรอดชีวิต (%)
5	97.55^{a}±1.76
10	95.09^{b}±0.83
20	91.72^{c}±0.66
30	87.85^{d}±0.55

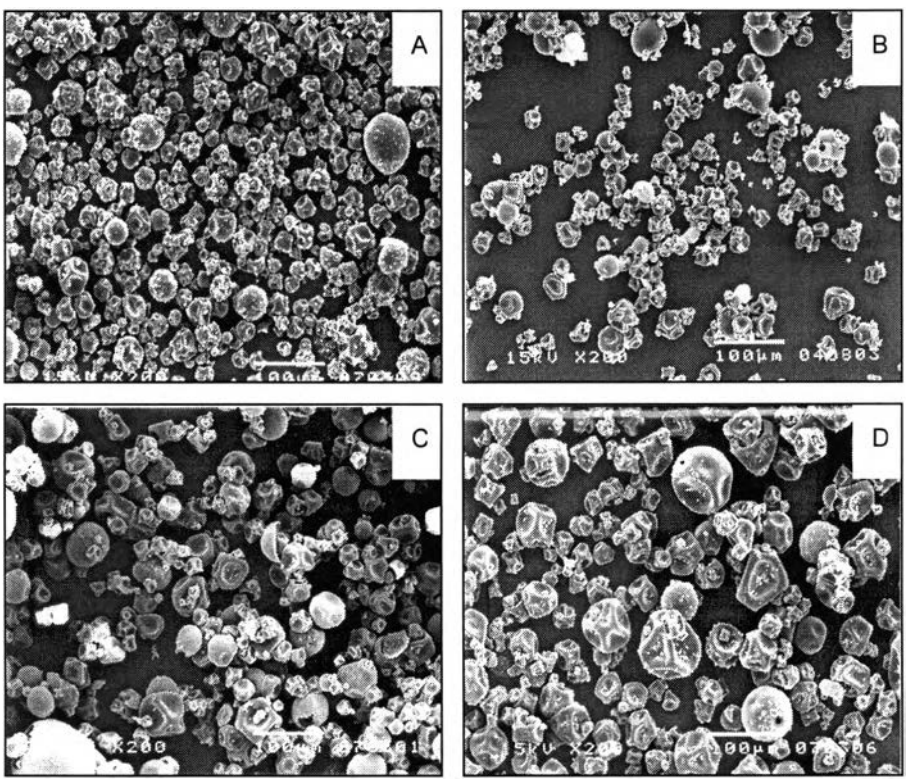
ตัวอักษร a,b,c,... ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกัน หมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่ม MNF ในสารละลายเป็น 5% 10% 20% และ 30% สารละลายมีความหนืดเท่ากับ 1.87±0.09 cP 2.26±0.04 cP 3.86±0.29 cP และ 5.52±0.15 cP ตามลำดับ โดยค่าความหนืดนั้นเพิ่มขึ้นในรูปแบบ exponential ตามสมการ $\mu_a = \mu_0 e^{AC}$ โดยที่ μ_a คือค่าความหนืด C คือความเข้มข้นของสารละลาย A คือค่าคงที่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.04 และ μ_0 คือค่าคงที่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.53 ซึ่งเป็นรูปแบบการเพิ่มขึ้นสำหรับของเหลวที่เป็น Newtonian และสารละลาย MNF เป็นของเหลวที่จัดอยู่ในประเภทนี้ ทำให้เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นความหนืดจึงเพิ่มขึ้นในระดับยกกำลัง และค่าของความหนืดยังมีอิทธิพลต่อขนาดอนุภาคด้วยคือ เมื่อความหนืดของ MNF เพิ่มขึ้นขนาดอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังรูป 4.2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Espina and Packard (1979) และ Boza, *et al.* (2004) ที่รายงานว่า เมื่อความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์เพิ่มสูงขึ้นความหนืดจะเพิ่มขึ้นส่งผลให้อนุภาคผงหลังทำแห้งมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยทั่วไปแล้วขนาดของอนุภาคจะแปรผันตรงกับขนาดของหยด ซึ่งได้รับการทดสอบและเปรียบเทียบกันแล้วด้วยวิธี Laser diffraction โดย (Elversson, 2005) เมื่อตัวอย่างมีความหนืดสูงขึ้นนั้นโมเลกุลมีการเกาะกันมาก การกระจายเป็นละอองฝอยต่ำ ประกอบกับหยดที่มีความเข้มข้นสูงนั้นจะมีความหนาแน่นต่อหยดสูงด้วย ทำให้มีความต้านทานต่อการบีบอัดอันเนื่องจากแรงเหวี่ยงของ atomizer ได้สูงอนุภาคจึงมีขนาดโต



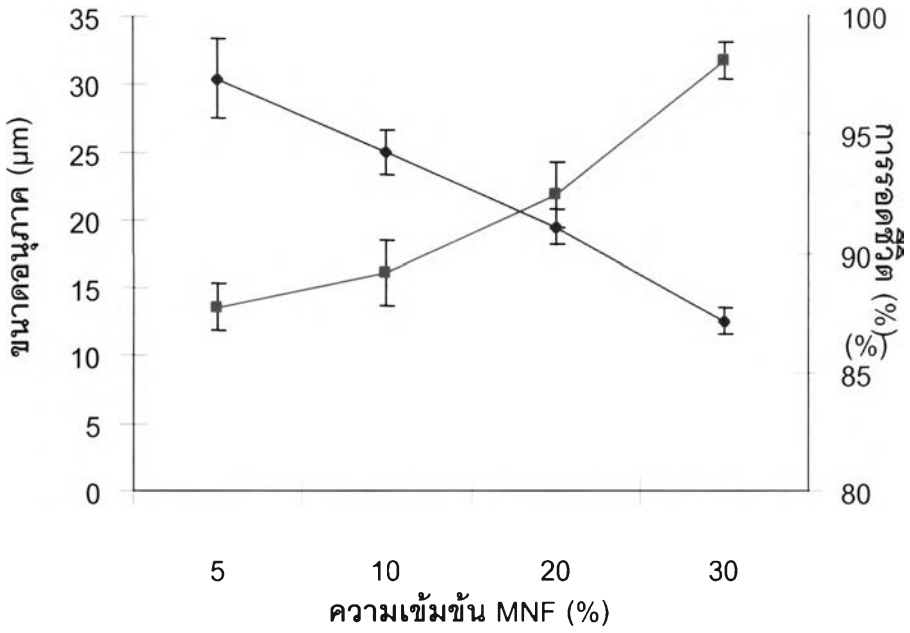
รูปที่ 4.2 **ความเข้มข้นของสารละลาย MNF กับค่าความหนืด(■)และ ขนาดอนุภาค (◆)**

สารละลาย MNF ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อผ่านการทำแห้งแล้วจะได้ลักษณะเป็นผงที่มีขนาดแตกต่างกันดังรูปที่ 4.3 ซึ่งขนาดที่ไม่เท่ากันนี้ ส่งผลให้เชื้อรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p \leq 0.05$) โดยที่ระดับความเข้มข้น 5% 10% 20% และ 30% ทำให้เชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 97.55±1.76% 95.09±0.83% 91.72±0.66% และ 87.85±0.55% ตามลำดับ (วิธีคิดจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตนั้น แสดงไว้ในภาคผนวก ก ข้อ 2)

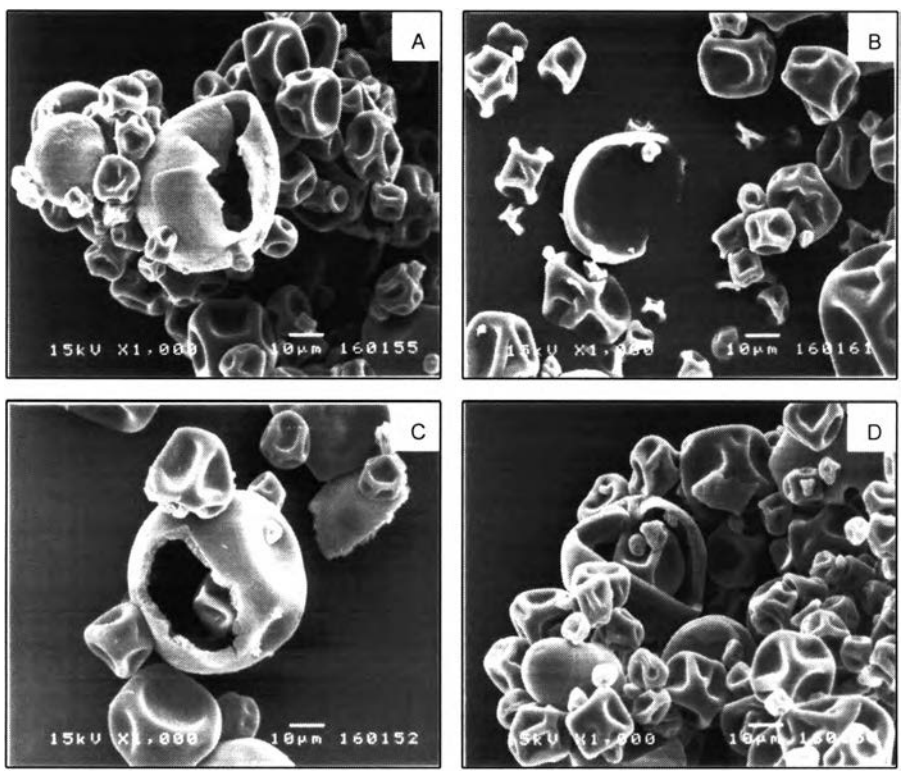


รูปที่ 4.3 **ลักษณะอนุภาคที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นกระจายถ่ายด้วยเครื่อง** Scanning Electron Microscope (SEM) **ของสารละลาย** MNF **ความเข้มข้น** 5% (A) 10% (B) 20% (C) **และ** 30% (D)

สารละลาย MNF ที่มีความเข้มข้นสูงนั้นให้อนุภาคผงขนาดใหญ่ ดังรูปที่ 4.3 ส่งผลให้เชื้อรอดชีวิตหลังทำแห้งต่ำ ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Espina and Packard (1979) ที่รายงานว่า เชื้อผงที่มีขนาดอนุภาคเล็กนั้น เชื้อรอดชีวิตหลังทำแห้งสูงกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ เนื่องจากอนุภาคที่ใหญ่ไอน้ำใช้เวลาในการระเหยออกนอกอนุภาคนานกว่าอนุภาคเล็กเนื่องจากมีเส้นผ่านศูนย์กลางสูงกว่า มีการศึกษาถึงสาเหตุการเสียชีวิตของเชื้อหลังทำแห้งโดย Teixeira, *et al.* (1995b); Gardiner, *et al.* (2000) และ Laroche and Gervais (2003) รายงานว่า ระหว่างการทำแห้งนั้นโมเลกุลของน้ำที่จับอยู่กับโมเลกุลของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะฟอสโฟลิปิดมีพลังงานจลน์เกิดการสั่นสะเทือนทำให้พันธะไดซัลไฟด์และ H-bond ซึ่งเป็นพันธะที่รักษาโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนและทำให้โปรตีนมีความคงตัวนั้น อ่อนตัวลง เมื่อแรงดังกล่าวอ่อนตัวลง โครงสร้างโปรตีนจึงเปลี่ยนไป ทำให้เกิดช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จนสูญเสียหน้าที่ในการคัดเลือกสารเข้าออกจากเซลล์ ของเหลวภายในเซลล์สามารถซึมผ่านออกสู่ภายนอกจนไม่สามารถคงกระบวนการเมทาบอลิซึมให้เป็นปกติได้ และความร้อนที่สูงยังส่งผลต่อ DNA ของเชื้อให้เปลี่ยนสภาพไป จนไม่สามารถจำลองลักษณะทางพันธุกรรมของเซลล์ได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่สูงขึ้น ผนังอนุภาค (shell) ที่เกิด case hardening มีความหนามากขึ้นดังรูปที่ 4.5 แม้นจะสังเกตจากรูปได้ไม่ชัดเจนนักเนื่องจากลักษณะของรูปอยู่ในองศาไม่พอเหมาะกับการมองเห็นแต่สามารถวัดความหนาของเปลือกอนุภาคได้เท่ากับ 1.5 μm 3 μm 4 μm และ 5 μm เมื่อสารละลาย MNF มีความเข้มข้น 5% 10% 20% และ 30% (w/v) ตามลำดับ ส่งผลให้ความร้อนถูกระเหยจากอนุภาคได้ไม่ดี จึงมีเวลาสัมผัสกับเชื้อได้มากทำให้เชื้อถูกทำลายได้มากกว่า (Boza, *et al.*, 2004) แต่หากสารปกป้องเซลล์มีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะทำให้ผนังอนุภาคบางดังรูปที่ 4.5 ภาพA ความร้อนจะสัมผัสกับเชื้อได้โดยตรงและตลอดเวลาเชื้อจึงถูกทำลายด้วยความร้อนมากขึ้น ประกอบกับอนุภาคที่มีผนังบางมีโอกาสแตกหักง่ายความร้อนสามารถเข้าไปทำลายเชื้อด้านในอนุภาคได้เชื้อมีโอกาสถูกทำลายด้วยความร้อนสูง ดังนั้นจึงต้องมีความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่พอเหมาะเพื่อให้ผนังอนุภาคไม่บางหรือหนาเกินไป ให้เป็นฉนวนกันความร้อนจากภายนอกและมีการระบายความร้อนออกจากอนุภาคได้ดี (Lian, *et al.*, 2001) เชื้อรอดชีวิตมากหรือน้อยหลังทำแห้งนั้นเนื่องจากอิทธิพลของความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์เพียงประการเดียวโดยไม่มีอิทธิพลจากอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อกับสารปกป้องเซลล์และจำนวนเชื้อก่อนทำแห้งเนื่องจากได้ควบคุมให้เท่ากันในเบื้องต้นแล้ว



รูปที่ 4.4 **ความเข้มข้นสารละลาย** MNF **ที่มีผลต่อขนาดอนุภาค (■)และจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (●)**



รูปที่ 4.5 **ลักษณะเปลือกของอนุภาคที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นกระจายถ่ายด้วยเครื่อง** Scanning Electron Microscope (SEM) **ของสารละลาย** MNF **ความเข้มข้น** 5% (A) 10% (B) 20% (C) **และ** 30% (D)

1259082X

นอกจากขนาดอนุภาคเชื้อผงจะส่งผลถึงการรอดชีวิตของเชื้อแล้วยังส่งผลต่อปริมาณความชื้นซึ่งมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อด้วยเช่นกัน โดย Zayed and Roos (2004) ได้รายงานว่า ปริมาณความชื้นคงเหลือในอนุภาคที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 2.8-5.6% หากปริมาณความชื้นต่ำกว่านี้จะทำให้เชื้อสูญเสียน้ำมากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ แต่หากความชื้นสูงกว่านี้จะส่งผลให้ค่า a_w สูงและอาจเกิดปัญหาในขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อได้ จากตารางที่ 4.2 ปริมาณความชื้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออนุภาคเชื้อผงมีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่หากมีความเข้มข้นสูงกว่านี้เชื่อว่าจะสามารถเห็นความแตกต่างของปริมาณความชื้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้อย่างชัดเจน โดยปกติเชื้อผงที่ทำแห้งในเครื่องทำแห้งชนิดเดียวกัน มีอัตราการไหลของลมร้อนและอัตราการป้อนตัวอย่างเท่ากันแล้ว หยดของตัวอย่างเมื่อผ่าน atomizer ไม่ว่าจะมีความเข้มข้นระดับใดจะมีระยะเวลาอยู่ในถังทำแห้งและสัมผัสกับความร้อนเท่ากัน (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) ดังนั้นหยดขนาดใหญ่จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการแลกเปลี่ยนความร้อนเพื่อระเหยน้ำนานกว่าหยดขนาดเล็กที่สามารถรับความร้อนและระเหยน้ำออกไปได้ทันที เมื่อเชื้อผงถูกนำออกจากเครื่องทำแห้ง อนุภาคที่มีขนาดใหญ่จึงเหลือน้ำที่ไม่ถูกระเหยสูงกว่าจึงมีความชื้นในอนุภาคสูงกว่า

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อปริมาณความชื้นในเชื้อผงเมื่อมีขนาดอนุภาคหลังทำแห้งที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลาย MNF (%)	ความชื้นเชื้อผง^{ns} (%)	ขนาดอนุภาคเชื้อผง (μm)
5	3.16±0.03	13.53^{d}±1.73
10	3.17±0.02	16.08^{c}±2.44
20	3.45±0.10	21.76^{b}±2.42
30	3.54±0.39	31.64^{a}±1.34

ตัวอักษร ns หมายความว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวอักษร a,b,c,... ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

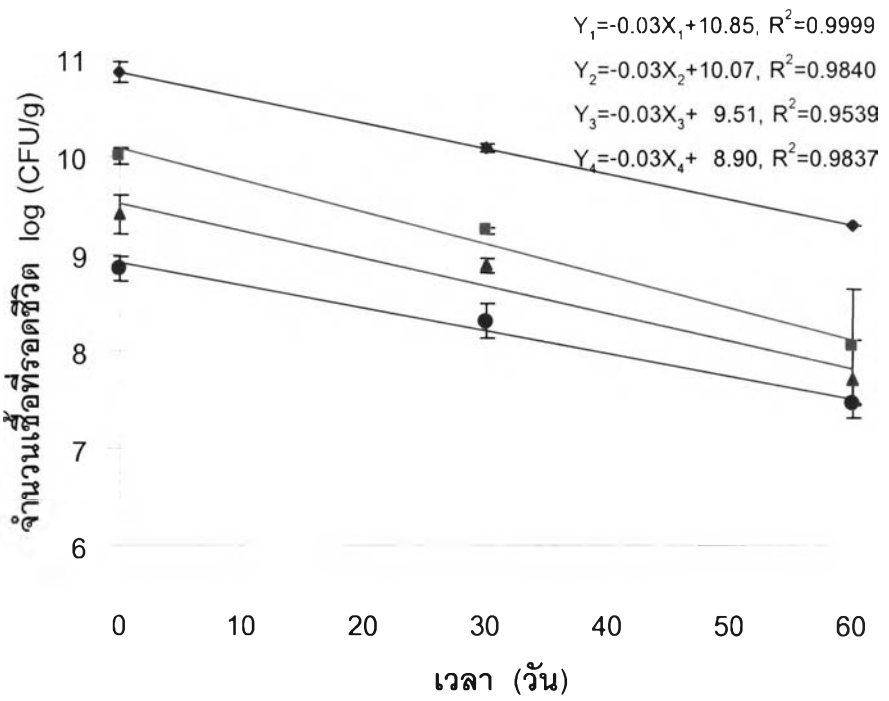
4.2.2 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อการรอดชีวิตของเชื้อผงระหว่างการเก็บรักษา

เชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นกระจายเมื่อมีสารละลาย MNF 5% 10% 20% และ 30% (w/v) เป็นสารปกป้องเซลล์นั้นได้ถูกนำมาบรรจุและปิดผนึกแบบสุญญากาศในถุง laminated aluminium foil ประกอบด้วยชั้น PP/PE/Alu/PE/LL เพื่อป้องกัน O_2 ความชื้นและแสง ซึ่ง Porubcan and Sellers (1975) รายงานว่า หากมีปัจจัยเหล่านี้ในปริมาณมาก ทำให้เชื้อรอดชีวิตลดลงในระหว่างการเก็บรักษามาก ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อผงพบว่า ความเข้มข้นของ MNF ไม่มีผลต่อการลดลงของเชื้อระหว่างเก็บรักษาที่ 20°C ดังรูปที่ 4.6 ซึ่งกราฟมีความชันใกล้เคียงกันแต่มีผลต่อเชื้อที่เก็บในอุณหภูมิ 30°C ดังรูปที่ 4.7 ดังนี้คือ สารละลาย MNF ความเข้มข้น 5 % ทำให้อัตราการลดลงของเชื้อสูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆ โดยพบว่า MNF 5 % กราฟเส้นตรงมีความชันเท่ากับ -0.07 สูงกว่าค่าความชันของความเข้มข้น 10% 20% และ 30% ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.06, ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก ความเข้มข้น 5% นั้น อาจเป็นความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป ทำให้ผนังอนุภาค (shell) มีความบางมากมีคุณสมบัติความเป็นฉนวนน้อย (ความหนาของอนุภาคแปรผันตรงกับความเข้มข้น) ความร้อนสามารถสัมผัสกับเชื้อได้โดยตรงและตลอดเวลา ถึงแม้ความเข้มข้น 5% จะสามารถระบายความร้อนได้ดีทำให้เชื้อรอดชีวิตสูงสุด ซึ่งอาจเป็นส่วนของเชื้อที่อยู่ด้านในอนุภาค แต่เชื้อที่อยู่ด้านนอกและสัมผัสกับความร้อนตลอดเวลานั้นกลับได้รับบาดเจ็บมาก เชื้อผงที่มีสารละลาย MNF 5 % เป็นสารปกป้องเซลล์ เมื่อเก็บรักษาในภาวะที่ไม่เหมาะสม และมีจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บสูงกว่า MNF 10 % นั้น จึงมีเชื้อที่รอดชีวิตต่ำกว่าเมื่อเวลาผ่านไปดังผลการทดลองข้างต้น ส่วนการเก็บรักษาที่ 20°C ไม่เห็นความแตกต่าง เนื่องจากที่อุณหภูมินี้เชื้อมีกิจกรรมต่ำจึงไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของเชื้ออย่างชัดเจน นอกจากนี้จากรูป 4.6 และ 4.7 ยังพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยชะลออัตราการลดลงของเชื้อได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง (สังเกตจากความชันมีค่าต่ำกว่า) และเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น การรอดชีวิตของเชื้อมีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับที่ Teixeira, *et al.* (1995b) รายงานว่า เชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำนั้น เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเชื้อลดลงต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงนั้น (30°C) ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ (37°C) ทำให้เซลล์มีกิจกรรมมากขึ้น

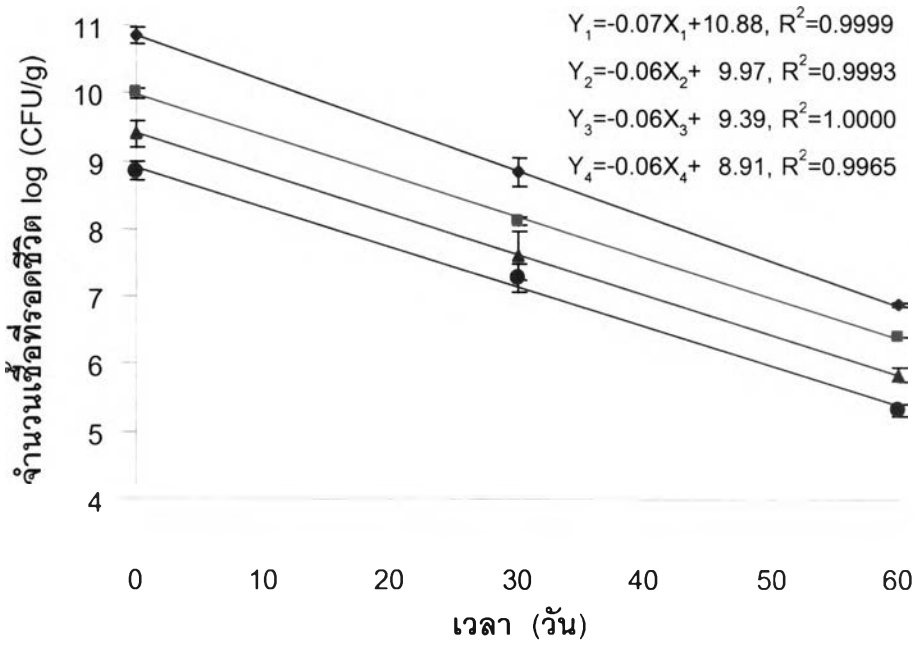
ความชื้นและค่า a_w ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการเก็บรักษาดังแสดงในตารางที่ 4.3 นั้น ผลพบว่า ที่เวลา 30 วัน ปริมาณความชื้นและค่า a_w เพิ่มขึ้นจากหลังทำแห้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งที่มีบรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันความชื้นได้ดี ความชื้นที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเกิดจาก ผงมีการดูดความชื้นกลับซึ่งมีสาเหตุจากมีปริมาณความชื้นในอากาศสูงขณะบรรจุเชื้อผงลง

บรรจุภัณฑ์ และความชื้น ค่า a_w ที่เพิ่มขึ้นของเชื้อผงนั้น ไม่มีผลอันเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นของสารละลาย MNF ที่เพิ่มขึ้น สังเกตจากปริมาณความชื้นและค่า a_w ที่เพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เป็นผลมาจากอุณหภูมิการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน ซึ่งการเก็บที่ 30°C เชื้อผงมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ 20°C สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang, *et al.* (2004) ที่รายงานว่า เชื้อที่บรรจุในถุง laminated เมื่อเก็บในอุณหภูมิสูงจะมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาส่งผลให้เชื้อมีค่า a_w สูงขึ้นด้วย จากการศึกษาของ Teixeira and Kirby (1995b) รายงานว่าค่า a_w ที่ทำให้เชื้อรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาสูงสุดคือ 0.11-0.23 จากการทดลองนี้พบว่า ค่า a_w มีค่า 0.28-0.56 ซึ่งสูงกว่าค่าที่เหมาะสมมาก ทำให้เชื้อลดลงในระหว่างการเก็บรักษามาก เมื่อครบ 60 วัน ที่ 20°C มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตสูงสุดเพียงแค่ 9.29-7.46 log (CFU/g) และที่ 30°C มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตสูงสุดเพียงแค่ 6.88-5.33 log (CFU/g) ซึ่งมีแนวโน้มลดลงอีกเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น และอาจลดลงต่ำกว่ามาตรฐานเชื้อในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ วารุณี ประดิษฐ์-ศรีกุล (2548) รายงานว่าต้องมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อยเท่ากับ 10^6 CFU/g ของผลิตภัณฑ์แห้ง

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าสารละลาย MNF ความเข้มข้น 5% และ 10% เชื้อมีการรอดชีวิตสูงสุด 2 อันดับแรก แต่ Lian, *et al.* (2001) รายงานว่าความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่น้อยเกินไปนั้นมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ต่ำ ทำให้มีจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บมาก ดังนั้นถึงแม้ว่าสารละลาย MNF 5% มีเชื้อรอดชีวิตสูงสุดเนื่องจากมีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด แต่เป็นไปได้ว่าอาจมีเชื้อที่บาดเจ็บเป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงเลือกสารละลาย MNF 10% เป็นความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมในการทำแห้งเชื้อผงขั้นต่อไป เนื่องจากมีจำนวนเชื้อหลังทำแห้งสูงและน่าจะมีจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บในปริมาณต่ำด้วย



รูปที่ 4.6 **สารละลาย** MNF **ความเข้มข้น** 5% (◆Y_1) 10% (■Y_2) 20% (▲Y_3) **และ** 30% (●Y_4) **ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อผงเมื่อเก็บรักษาที่** 20°C **ในถุง** laminate aluminium foil



รูปที่ 4.7 **สารละลาย** MNF **ความเข้มข้น** 5% (◆Y_1) 10% (■Y_2) 20% (▲Y_3) **และ** 30% (●Y_4) **ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อผงเมื่อเก็บรักษาที่** 30°C **ในถุง** laminate aluminium foil

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ที่มีผลต่อความชื้นและค่า a_w ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อผงซึ่งบรรจุในถุง laminated aluminium foil เป็นเวลา 60 วัน ที่ 20 และ 30°C

ความเข้มข้น MNF (%)	อุณหภูมิการเก็บรักษา (°C)	ความชื้น (%)			a_w		
		0 วัน	30 วัน	60 วัน	0 วัน	30 วัน	60 วัน
5	20	$3.16^{a}\pm0.25$	$4.15^{b}\pm1.00$	$4.26^{b}\pm0.05$	$0.28^{a}\pm0.03$	$0.37^{b}\pm0.01$	$0.39^{b}\pm0.00$
	30	$3.16^{a}\pm0.25$	$4.43^{b}\pm0.31$	$4.64^{b}\pm0.04$	$0.28^{a}\pm0.03$	$0.44^{b}\pm0.04$	$0.52^{c}\pm0.03$
10	20	$3.17^{a}\pm0.02$	$4.24^{b}\pm0.08$	$4.32^{b}\pm0.14$	$0.28^{a}\pm0.03$	$0.37^{b}\pm0.01$	$0.40^{c}\pm0.01$
	30	$3.17^{a}\pm0.02$	$4.59^{b}\pm0.16$	$4.61^{b}\pm0.21$	$0.28^{a}\pm0.03$	$0.44^{b}\pm0.02$	$0.55^{c}\pm0.00$
20	20	$3.45^{a}\pm0.10$	$4.38^{b}\pm0.18$	$4.40^{b}\pm0.30$	$0.29^{a}\pm0.03$	$0.38^{b}\pm0.02$	$0.40^{b}\pm0.04$
	30	$3.45^{a}\pm0.10$	$4.73^{b}\pm0.1$	$4.87^{b}\pm0.39$	$0.29^{a}\pm0.03$	$0.47^{b}\pm0.03$	$0.56^{c}\pm0.01$
30	20	$3.54^{a}\pm0.39$	$4.46^{b}\pm0.12$	$4.57^{b}\pm0.03$	$0.29^{a}\pm0.01$	$0.38^{b}\pm0.03$	$0.42^{b}\pm0.02$
	30	$3.54^{a}\pm0.39$	$4.73^{b}\pm0.3$	$4.92^{b}\pm0.13$	$0.29^{a}\pm0.01$	$0.46^{b}\pm0.04$	$0.56^{b}\pm0.04$

ตัวอักษร a,b,c,... ที่กำกับตัวเลขในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

4.2.3 อุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อนที่เหมาะสมขณะทำแห้งแบบพ่นกระจาย

ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ นอกจากจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการรอดชีวิตแล้ว อุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อนยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อผงเช่นกัน เชื้อที่นำมาศึกษาถึงอิทธิพลของอุณหภูมิลมข้าและอัตราการป้อน จะถูกทำแห้งแบบพ่นกระจาย โดยแปรอุณหภูมิลมเข้า 160°C และ 180°C และอัตราการป้อน 34 mL/min และ 16 mL/min วางแผนการทดลองแบบ factorial design เพื่อดูการมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัยดังกล่าว พบว่าทั้งสองปัจจัยไม่ได้มีอิทธิพลร่วมกันต่อจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ดังตารางที่ 4.4 แต่เมื่อพิจารณาทีละปัจจัยพบว่า ทั้งอุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อนต่างก็มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ จากตารางที่ 4.5 และ 4.6 จะเห็นว่า อุณหภูมิลมเข้าที่เพิ่มขึ้น การรอดชีวิตจะลดลง และเมื่อลดอัตราการป้อนจาก 34 mL/min เป็น 16 mL/min ทำให้อุณหภูมิลมออกเพิ่มขึ้นจาก 80°C เป็น 90°C การรอดชีวิตของเชื้อลดลงเช่นกัน (ซึ่งอุณหภูมิลมออกนี้แปรผกผันกับอัตราการ

ป้อน) สอดคล้องกับการทดลองของ Kim and Bhowmik (1990) ที่รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิลมเข้าและลมออกเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ การรอดชีวิตลดลงเช่นกัน โดยพบว่าที่อุณหภูมิลมเข้า 160°C การรอดชีวิตมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิลมเข้า 170°C และที่อุณหภูมิลมออกต่ำได้แก่ 60°C 70°C 80°C การรอดชีวิตสูงกว่าที่อุณหภูมิลมออกสูงคือ 90°C จากผลการทดลอง Gardiner, *et al.* (2002) ได้รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิการทำแห้งสูงขึ้น เชื้อสัมผัสความร้อนมาก ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์มาก ทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์มากขึ้น เซลล์จึงสูญเสียน้ำซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการเมทาบอลิซึม รวมถึงความร้อนที่สูงทำให้ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นที่อุณหภูมิลมเข้าและลมออกสูงทำให้เชื้อได้รับบาดเจ็บระหว่างการทำแห้งมาก การรอดชีวิตของเชื้อจึงลดลง

ส่วนผลของปริมาณความชื้นและค่า a_w ของเชื้อผงหลังทำแห้งพบว่า ไม่ได้เป็นผลจากการมีอิทธิพลร่วมกันระหว่างอุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อน แต่ขึ้นอยู่กับอัตราการป้อนเพียงอย่างเดียวคือ เมื่ออัตราการป้อนสูง (อุณหภูมิลมออกมีค่าประมาณ 80°C) ความชื้นและค่า a_w จะมีค่าสูง หรือในทางกลับกัน หากอัตราการป้อนต่ำ (อุณหภูมิลมออกมีค่าประมาณ 90°C) ความชื้นและค่า a_w จะมีค่าต่ำด้วย ซึ่ง Kim and Bhowmik (1990) อธิบายไว้ว่าที่อัตราการป้อนสูง ปริมาณของตัวอย่างที่ผ่านเข้าถังทำแห้งจะสูงกว่าที่อัตราการป้อนต่ำ จึงมีปริมาณน้ำในระบบมาก ดังนั้นการได้รับความร้อนและเวลาในการระเหยที่จำกัด จึงทำให้เชื้อผงจากภาวะที่มีอัตราการป้อนสูงคงเหลือปริมาณน้ำที่ยังไม่ถูกระเหยอยู่มากกว่า ของปริมาณความชื้นเชื้อผงในการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Fu and Etzel (1995) ซึ่งรายงานว่าเชื้อผงมีความชื้นประมาณ 4.31-5.80% เมื่ออุณหภูมิลมออกมีค่า 80°C และประมาณ 2.4-3.7% เมื่ออุณหภูมิลมออกมีค่า 90°C ตามลำดับ ถึงแม้จะมีอุณหภูมิลมเข้าที่แตกต่างกันกับการทดลองนี้ก็ตาม แสดงว่าอุณหภูมิลมเข้าไม่ได้มีผลต่อปริมาณความชื้นและค่า a_w

เชื้อผงที่ทำแห้งโดยแปรอัตราการป้อนเป็น 34 mL/min มีปริมาณความชื้นที่วิเคราะห์ได้ในข้อ 4.2.2 นั้นเท่ากับ 4.08-4.73 % (ตารางที่ 5ค ภาคผนวก) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อผงในข้อนี้พบว่า ปริมาณความชื้นและค่า a_w ในข้อนี้สูงกว่าเล็กน้อยเนื่องจาก ค่าความเร็วลม (ตารางที่ 4ค ภาคผนวก) ในกระบวนการต่ำกว่าตอนต้น ทำให้การนำความชื้นออกจากถังทำแห้งช้ากว่าข้างต้น จึงมีความชื้นเหลือในผลิตภัณฑ์สูงกว่าเล็กน้อย ถึงแม้จะทำแห้งที่อัตราการป้อนระดับเดียวกันก็ตาม

จากผลการทดลอง ถึงแม้ว่าการทำแห้งที่อุณหภูมิลมเข้า 160°C อัตราการป้อน 34 mL/min ทำให้เชื้อรอดชีวิตสูงสุด แต่เชื้อผงที่ผลิตได้นั้นปริมาณความชื้นมีแนวโน้มสูงเกินระดับมาตรฐานอุตสาหกรรมนมผงกำหนดไว้คือ 5% การทำแห้งครั้งต่อไปจึงต้องแปรอัตราการป้อนเป็น

16 mL/min เพื่อลดปริมาณความชื้นในเชื้อผงและแปรอุณหภูมิลมเข้าระดับเดิมคือ 160°C เนื่องจากอุณหภูมิลมเข้าระดับนี้เชื้อรอดชีวิตสูงกว่าที่อุณหภูมิ 180°C

ตารางที่ 4.4 ค่าความแปรปรวนระหว่างอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิลมเข้าและ อัตราการป้อนตัวอย่างต่อการรอดชีวิต ความชื้น และค่า a_w ของเชื้อผงหลังทำแห้ง

S. O. V.	การรอดชีวิต (%)	ความชื้น (%)	a_w
Treatment			
Inlet air	*	ns	ns
อัตราการป้อน	*	*	*
inlet air * อัตราการป้อน	ns	ns	ns

* หมายความว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายความว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิลมเข้าที่มีผลต่อการรอดชีวิต ความชื้น และค่า a_w ของเชื้อผง

อุณหภูมิลมเข้า (°C)	การรอดชีวิต (%)	ความชื้น^{ns} (%)	a_w^{ns}
160	94.17^a	3.47	0.31
180	92.07^b	3.23	0.31

ตัวอักษร a,b ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายความว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.6 ผลของอัตราการป้อนตัวอย่าง (feed rate) **ที่มีผลต่อการรอดชีวิต ความชื้น และค่า a_w ของเชื้อผง**

Feed rate (mL/min)	การรอดชีวิต (%)	ความชื้น (%)	a_w
16	91.57[b]	2.30[b]	0.28[b]
34	94.67[a]	4.41[a]	0.34[a]

ตัวอักษร a,b ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.4 การปรับปรุงเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อผงหลังทำแห้ง

4.2.4.1 ค่าแรงตึงผิวและความหนืดของ MNF ผสมน้ำตาลที่ใช้เป็นสารปกป้องเซลล์

จากผลการศึกษาในข้อ 4.2.1 ทำให้ทราบว่าขนาดหยดมีผลต่อ การรอดชีวิตของเชื้อหลังทำแห้ง การลดขนาดของหยดลงจึงน่าจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อผงหลังทำแห้งได้ จากสมการ Kim-mashall (ในภาคผนวก ก ข้อ 5) Elversson (2005) ได้รายงานว่าขนาดอนุภาคนั้นขึ้นกับความหนืด ความหนาแน่นและแรงตึงผิว เพราะฉะนั้น หากควบคุมให้ความหนืดและความหนาแน่นของสารปกป้องเซลล์ไม่แตกต่างกันโดยกำหนดให้ปริมาณ total solids เท่ากัน และลดค่าแรงตึงผิวแล้ว น่าจะทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลงได้ จากผลการทดลองในข้อ 4.2.1 พบว่าสารละลาย MNF10 % นั้น เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อรอดชีวิตหลังทำแห้งและระหว่างการเก็บรักษาได้สูงเนื่องจากมีขนาดอนุภาคที่เหมาะสม จึงใช้ระดับความเข้มข้น MNF 10% นี้ เป็นเกณฑ์ ดังนั้นสารปกป้องเซลล์ชนิดใหม่ต้องมีค่าแรงตึงผิวที่ต่ำกว่า MNF 10% เพื่อให้อนุภาคเชื้อผงหลังผ่านการทำแห้งแล้วมีขนาดเล็กลง ซึ่งสามารถทำได้โดยนำสารที่มีสมบัติลดแรงตึงผิวผสมกับ MNF

ในงานวิจัยของ Mary, *et al.* (1993); Johnson and Etzel (1995); Meister, *et al.* (2000) และ Boza, *et al.* (2004) มีการนำน้ำตาลมาเป็นสารปกป้องเซลล์ร่วมกับ skim milk พบว่า สามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อผงได้ เนื่องจากน้ำตาลช่วยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีความเสถียรมากขึ้น นอกจากความสามารถในการเป็นสารปกป้องเซลล์ของน้ำตาลแล้ว งายวิจัยนี้ยังมีความสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นของน้ำตาลอีก คือ การมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว น้ำตาลที่นำมาใช้ได้แก่ น้ำตาล sucrose ซึ่งหาได้ง่ายราคาถูกมา

เป็นสารลดแรงตึงผิวให้กับ MNF เนื่องจากมีรายงานของ Servulo,*et al.* (2003) ว่า สารละลายน้ำตาล sucrose นั้น มีสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ น้ำตาลอีกชนิดหนึ่งที่นำมาช่วยลดแรงตึงผิวของ MNF คือ lactose เนื่องจาก Adhikari, *et al.* (2007) รายงานว่า สารละลายน้ำตาล lactose นั้น มีแรงตึงผิวลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จึงน่าจะช่วยลดแรงตึงผิวของ MNF ได้ และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นความหนืดก็เพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ประกอบกับน้ำตาล lactose ยังเป็นสารปกป้องเซลล์ที่ดีของการทำแห้งด้วย ดังนั้น น้ำตาล lactose จึงเป็นอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในการทดลอง

น้ำตาลที่นำมาผสมกับ MNF เพื่อเป็นสารปกป้องเซลล์ชนิดใหม่และช่วยให้มีขนาดอนุภาคที่เล็กลงนั้น ได้แปรสัดส่วนที่ระดับต่างๆโดยให้มีปริมาณ total solids เท่ากับ 10% มีสัดส่วนดังนี้คือ MNF 9%+sucrose 1% MNF 7%+sucrose 3% MNF 5%+sucrose 5% MNF 9%+lactose 1% MNF 7%+lactose 3% และ MNF 5%+lactose 5% ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวแสดงในตารางที่ 4.7 (การวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิวแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 4) พบว่าค่าแรงตึงผิวมีแนวโน้มลดลงจากเดิมคือที่ 53.01 dynes/cm เป็น 48.76-51.25 dynes/cm เมื่อในสัดส่วนนั้นมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแสดงว่าน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด สามารถลดแรงตึงผิวของ MNF ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และในน้ำตาลชนิดเดียวกันเมื่อมีปริมาณมากขึ้นค่าแรงตึงผิวจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นกัน โดยน้ำตาล sucrose มีแนวโน้มลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าน้ำตาล lactose ถึงแม้สารละลายน้ำตาลสามารถลดแรงตึงผิวได้ แต่ปริมาณน้ำตาลนั้นต้องไม่ทำให้สารปกป้องเซลล์มีค่าความหนืดสูงกว่า 2.26 cP ด้วย ซึ่งเป็นค่าความหนืดของ MNF 10% เนื่องจากความหนืดจะมีผลต่อขนาดของหยดสารละลายเช่นกัน

สารละลายน้ำตาลที่นำมาเสริมสารละลาย MNF เพื่อลดแรงตึงผิวของสารปกป้องเซลล์ วัดความหนืดแล้วได้ผลดังตารางที่ 4.7 พบว่า น้ำตาลที่เพิ่มเข้ามาทั้ง 2 ชนิด มีความหนืดอยู่ในช่วง 2.22-2.44 cP ซึ่งไม่ทำให้ความหนืดแตกต่างจากค่าเดิมคือ 2.26 cP และพบว่าแม้จะลดปริมาณสารละลาย MNF ลงจากเดิมคือ 10% เป็น 9% 7% และ 5% กลับไม่ทำให้ความหนืดของสารลดลง แตกต่างจากรูปที่ 4.2 ที่แสดงผลว่า เมื่อ MNF มีความเข้มข้นต่ำค่าความหนืดจะต่ำด้วย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากน้ำตาลที่เติมเข้ามาทำให้ความหนืดของสารปกป้องเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถทำให้ MNF 5 % มีค่าความหนืดที่ใกล้เคียงกับ MNF 10 % ได้ ถึงแม้การเติมน้ำตาลจะทำให้ค่าความหนืดเพิ่มขึ้นนั้น แต่สำหรับน้ำตาล lactose แล้ว ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น มีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งเป็นผลมาจากสมบัติของน้ำตาล lactose ที่ Adhikari, *et al.* (2007) ได้ศึกษาไว้แล้วว่า น้ำตาล lactose ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า สัดส่วนของ MNF ผสมน้ำตาลทุกชนิดและทุกความเข้มข้น สามารถลดแรงตึงผิวของ MNF 10 % ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$) ประกอบกับความหนืดของสารละลาย MNF ผสมน้ำตาลมีค่าต่ำกว่าค่าความหนืดของ MNF 10% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นทุกสัดส่วนข้างต้นน่าจะเพิ่มการรอดชีวิตได้ โดยช่วยลดขนาดอนุภาคของเชื้อผง ขั้นตอนต่อไป จึงนำทุกสัดส่วนข้างต้น ไปทำแห้งแบบพ่นกระจายและนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังทำแห้ง เพื่อพิสูจน์สมมติฐานที่ว่าสารละลาย MNF ผสมน้ำตาลจะสามารถเพิ่มการรอดชีวิตได้จริง

ตารางที่ 4.7 ค่าแรงตึงผิวและความหนืดของ MNF ผสมน้ำตาลที่ใช้เป็นสารปกป้องเซลล์เมื่อสารละลายมีองค์ประกอบแตกต่างกันแต่ total solids เท่ากัน

สารละลาย	แรงตึงผิว (dynes/cm)	ความหนืด^{ns}(cP)
MNF10%	53.01^{a}±0.43	2.26 ±0.04
MNF9%+sucrose1%	49.93^{c}±0.40	2.26± 0.02
MNF7%+sucrose3%	49.45 ^{d}±0.37	2.35± 0.23
MNF5%+sucrose5%	48.76^{e}±0.34	2.44± 0.05
MNF9%+lactose1%	51.25^{b}±0.73	2.22± 0.05
MNF7%+lactose3%	49.65^{cd}±0.31	2.22± 0.13
MNF5%+lactose5%	49.03^{e}±0.46	2.37± 0.40

ตัวอักษร a,b,c,... ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายความว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

4.2.4.2 การรอดชีวิตของเชื้อผงเมื่อใช้ MNF ผสมน้ำตาลเป็นสารปกป้องเซลล์

น้ำตาล sucrose และ lactose ที่นำมาเสริมในสารละลาย MNF เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวของสารปกป้องเซลล์ เมื่อนำไปทำแห้งพบว่า สามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อผงหลังทำแห้งมากกว่าการใช้สารละลาย MNF 10% เพียงชนิดเดียวดังตารางที่ 4.8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อผงที่ผลิตได้มีขนาดเล็กลงจากเดิม ดังรูปที่ 4.8 (ไม่แสดงรูปของ MNF 9%+lactose 1% และ MNF 5% +lactose 5% เนื่องจากในกลุ่มน้ำตาล lactose นั้น มีขนาดไม่แตกต่างกัน) อันเนื่องมาจากการมีค่าแรงตึงผิวที่ลดลงในตารางที่ 4.7 ดังรายงานของ Elversson (2005) ที่ว่าเมื่อแรงตึงผิวลดลง จะทำให้อนุภาคมีขนาดลดลง ผลของแรงตึงผิวต่อขนาดอนุภาคแสดงในตารางที่ 4.7 ถึงแม้ขนาดอนุภาคเชื้อผงจะลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับสารละลาย MNF 10% แต่ก็ลดลงมากเพียงพอที่จะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตให้มากขึ้นจากเดิมคือ 92.68% เป็น 94.68-97.05% อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารปกป้องเซลล์ชนิดเดียวกันแล้วพบว่า การรอดชีวิตในแต่ละสัดส่วนนั้นไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ทั้งนี้เนื่องมาจากขนาดของอนุภาคที่ไม่ต่างกัน ยกเว้นใน 2 สัดส่วนคือ สารละลาย MNF 7%+sucrose 3% และ MNF 5%+sucrose 5% ที่แรงตึงผิวลดลงแต่กลับมีอนุภาคโตกว่าสัดส่วนอื่นและเชื้อมี การรอดชีวิตสูงสุดอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก MNF 7%+sucrose 3% และ MNF 5%+sucrose 5% มีค่า bulk density ต่ำที่สุดดังตารางที่ 4.8 การที่เชื้อผงมีค่า bulk density ต่ำสุดทั้งที่ total solids เท่ากัน หมายความว่า MNF 7%+sucrose 3% มีความกลวงภายในอนุภาคมากกว่าทำให้ผนังของอนุภาคมีความบางมากกว่าสัดส่วนอื่น และมีการระบายความร้อนออกจากอนุภาคได้เร็ว (Espina and Packard, 1979) เชื้อจึงสัมผัสความร้อนสั้นกว่าผนังหนาคือถูกทำลายด้วยความร้อนน้อยกว่าและมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตสูงกว่า แม้จะมีอนุภาคที่โตกว่าก็ตาม

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าในสัดส่วนของ MNF 7%+sucrose 3% และ MNF 5%+sucrose 5% มีลักษณะพื้นผิวของอนุภาคหลังทำแห้งที่สัดส่วนอื่นไม่มีคือลักษณะรูพรุนดังรูปที่ 4.9 (C และ D) การที่อนุภาคมีรูพรุนนี้เอง ส่งผลให้ไอน้ำสามารถระเหยออกจากอนุภาคได้เร็วขึ้นกว่าอนุภาคที่ไม่มีรูพรุน ดังรูปที่ 4.9 (A B E F และ G) ทำให้ความร้อนถูกระบายออกจากอนุภาคได้เร็วขึ้น ส่งผลให้สารละลาย MNF 7%+sucrose 3% และ MNF 5%+sucrose 5% เชื้อรอดชีวิตสูงกว่าที่สาระลาย MNF 10% และสัดส่วนอื่นๆ และอนุภาคที่มีรูพรุนมากทำให้ความร้อนถูกระบายออกได้ดีกว่าการมีรูพรุนน้อย ดังนั้นสัดส่วนของสารละลาย MNF 7%+sucrose 3% เชื้อจึงรอดชีวิตสูงกว่าที่ MNF 5%+sucrose 5% และการเกิดลักษณะรูพรุนนี้จะทำให้อนุภาคสามารถขยายออกได้ดีเนื่องจากไอน้ำเคลื่อนผ่านรูพรุนทำให้เกิดแรงดัน

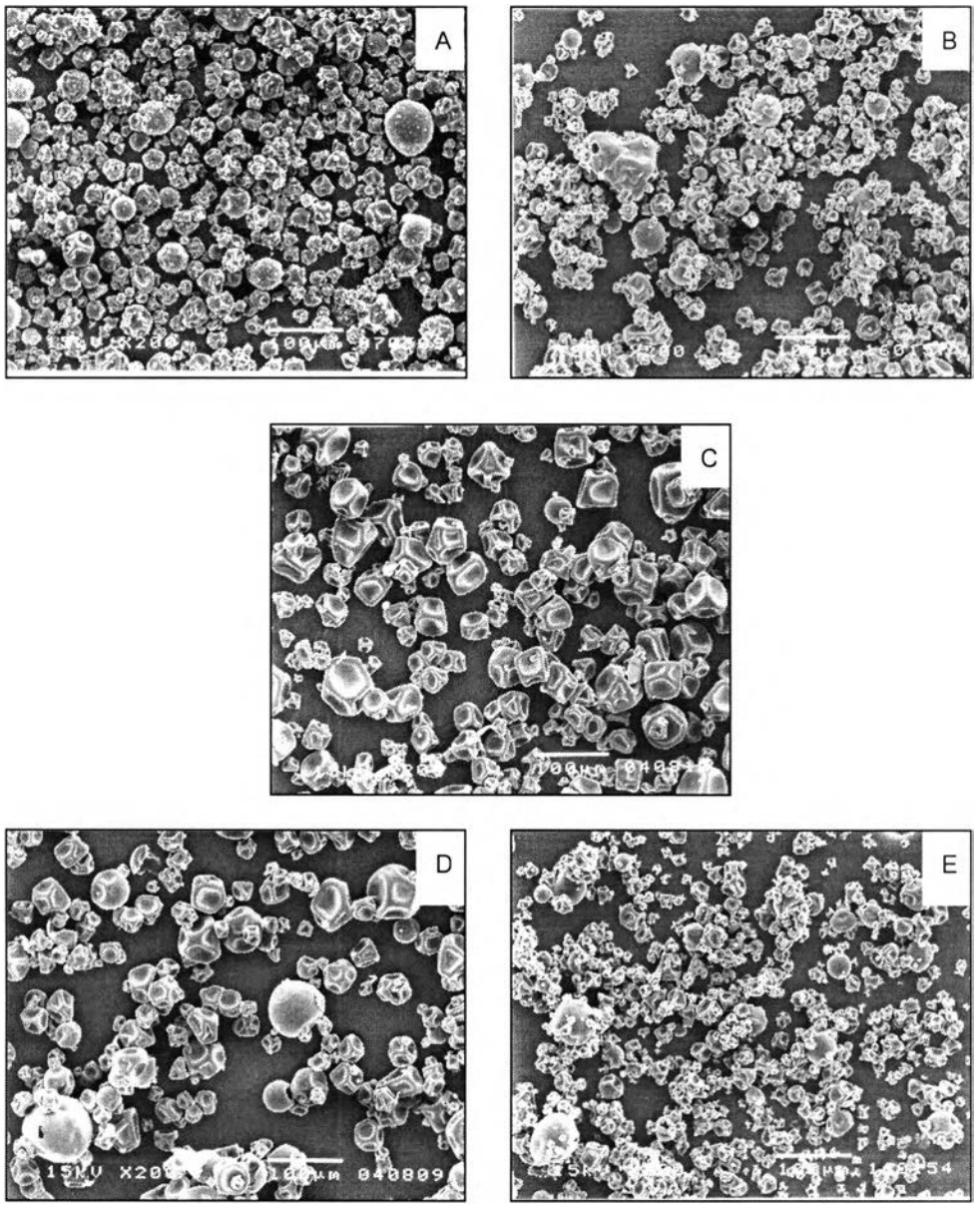
ภายในอนุภาคดันให้ผนังของอนุภาคขยายออกซึ่งทำให้สารละลาย MNF 7 %+sucrose 3 % และ MNF 5 %+sucrose 5 % มีขนาดอนุภาคโตกว่าสัดส่วนอื่นๆ และ MNF 7 %+sucrose 3 % มีขนาดโตกว่า MNF 5 %+sucrose 5 % ในสมบัติของน้ำตาล sucrose และ lactose นั้น เมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นกระจายแล้ว โครงสร้างของผนังอนุภาคจะเรียงตัวกันแบบ amorphous (Haque and Roos, 2006) ซึ่งภายในอนุภาคมีลักษณะกลวงและล้อมรอบด้วยชั้นของผนังอนุภาคในลักษณะเป็นเปลือกหุ้ม (shell) Chauca, *et al.* (2005) และ Elversson (2005) รายงานว่าน้ำตาล lactose และ sucrose ที่ถูกทำแห้งเพียงชนิดเดียว จะไม่เกิดลักษณะรูพรุน แต่หากเป็นส่วนผสมระหว่างโปรตีนกับน้ำตาลแล้ว จะเกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนรอบผิวอนุภาค ซึ่งน่าจะเกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลน้ำตาลกับโปรตีนที่ไม่แข็งแรงเท่าการจับกับน้ำตาลด้วยกันเอง เมื่อภายในอนุภาคมีแรงดันจึงทำให้โมเลกุลที่จับกันอย่างไม่แข็งแรงเกิดการแยกตัวขึ้นจนเห็นเป็นลักษณะรูพรุน (Hauque and Roos, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับในผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.9 (C และ D) พบว่าเมื่อน้ำตาลรวมกับนมแล้ว จะเกิดลักษณะที่เป็นรูขึ้น ปริมาณของรูพรุนจะลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นคือเข้าใกล้ความเป็นสารละลายน้ำตาลบริสุทธิ์มากขึ้น ในส่วนของน้ำตาล lactose กับ MNF นั้น ไม่เกิดลักษณะรูพรุนอาจเนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของ lactose ที่จับกับโมเลกุลของโปรตีนอยู่ในตำแหน่ง α จึงสามารถจับกับโมเลกุลของโปรตีนได้ง่ายและแข็งแรงกว่า sucrose ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่ง β ที่เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้ยากกว่า ดังรายงานของ Fieser and Fieser (1959) ที่กล่าวว่า โมเลกุลที่อยู่ในตำแหน่ง α นั้นสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ดีกว่าตำแหน่ง β ดังนั้น MNF : lactose จึงจับกันได้แข็งแรงกว่าใน MNF : sucrose เมื่อมีแรงดันในอนุภาคโมเลกุลของ MNF : lactose ที่สามารถจับกับโมเลกุลของโปรตีนได้แข็งแรงกว่าน้ำตาล sucrose การแยกตัวจึงเกิดน้อยกว่าและไม่เห็นลักษณะรูพรุน

ส่วนเชื้อผงที่มี MNF 9%+sucrose 1% และ MNF 9%+lactose 1% เป็นสารปกป้องเซลล์นั้นไม่เกิดลักษณะดังกล่าวหลังทำแห้ง อาจเนื่องจากมีปริมาณของน้ำตาลน้อยเกินไปสัดส่วนระหว่างสารละลาย MNF กับน้ำตาลจึงแตกต่างกันมาก โมเลกุลโปรตีนในนมจึงมีโอกาสจับกันเองมากกว่า ซึ่งมีความแข็งแรงเช่นกัน การแยกตัวจึงเกิดน้อยและไม่เกิดรูพรุนเหมือนกับ การทำแห้งโดยใช้สารปกป้องเซลล์สัดส่วนอื่น ดังรูปที่ 4.9 (A B F และ G)

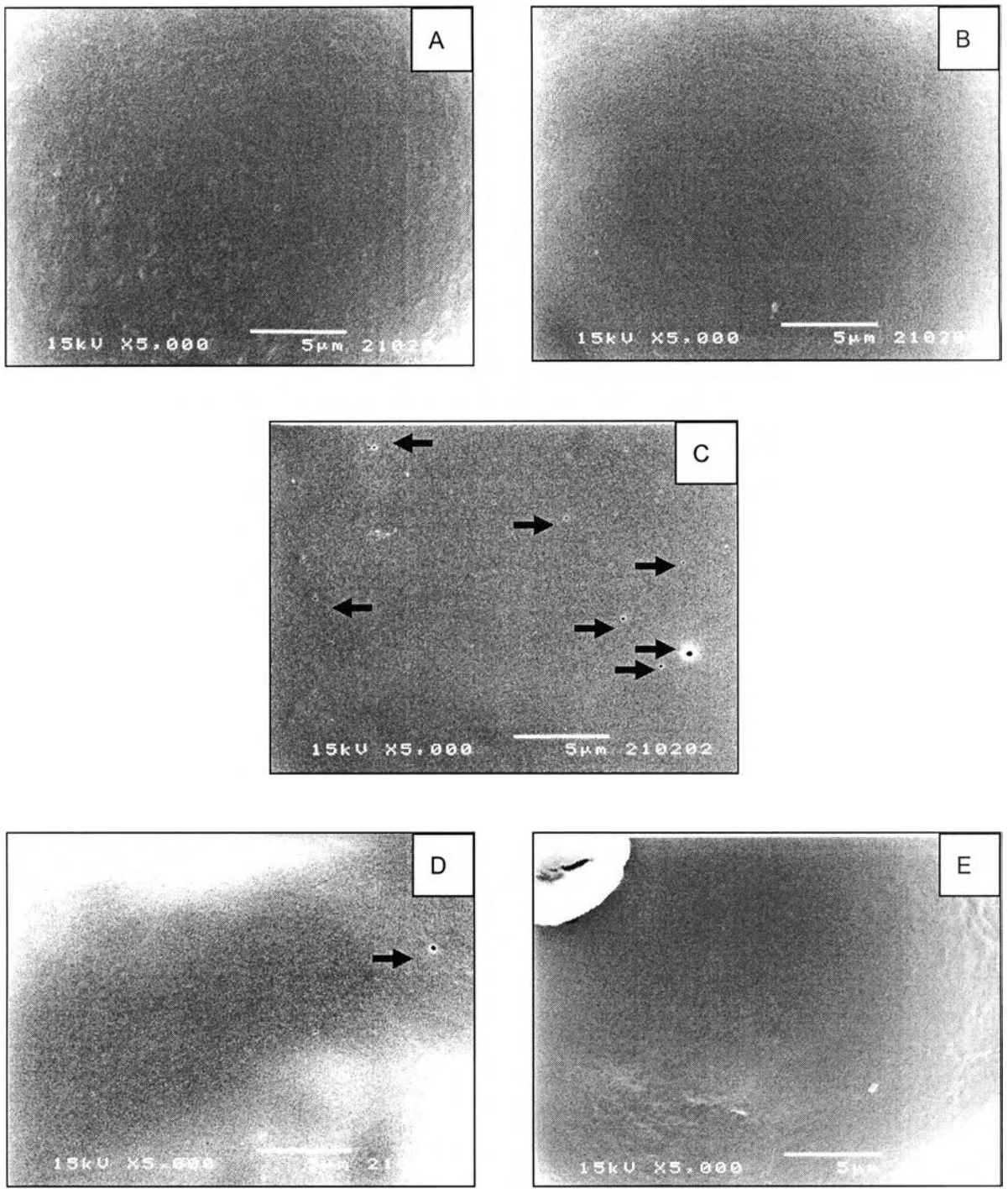
ตารางที่ 4.8 จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ค่าแรงตึงผิว ขนาดอนุภาคและค่า bulk density ของเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งเมื่อใช้ MNF ผสมน้ำตาลเป็นสารปกป้องเซลล์และมี total solids ไม่แตกต่างกัน

สารละลาย	การรอดชีวิต (%)	แรงตึงผิว (dynes/cm)	ขนาดอนุภาค (μm)	bulk density (g/mL)
MNF10%	92.68^{c}±0.78	53.01^{a}±0.43	16.08^{bc}±1.25	0.42^{a}±0.01
MNF9%+sucrose1%	95.36^{b}±0.48	49.93^{c}±0.40	15.29^{c}±1.75	0.42^{a}±0.02
MNF7%+sucrose3%	97.05^{a}±0.31	49.45^{d}± 0.37	20.95^{a}±1.61	0.36^{c}±0.00
MNF5%+sucrose5%	95.89^{ab}±0.39	48.76^{e}± 0.34	18.80^{b}±1.43	0.38^{b}±0.01
MNF9%+lactose1%	94.89^{b}±0.99	51.25^{b}± 0.73	15.62^{c}±1.05	0.42^{a}±0.03
MNF7%+lactose3%	95.18^{b}±0.73	49.65^{cd}± 0.31	15.14^{c}±1.72	0.42^{a}±0.00
MNF5%+lactose5%	94.68^{b}±0.78	49.03^{e}± 0.46	14.99^{c}±1.61	0.42^{a}±0.01

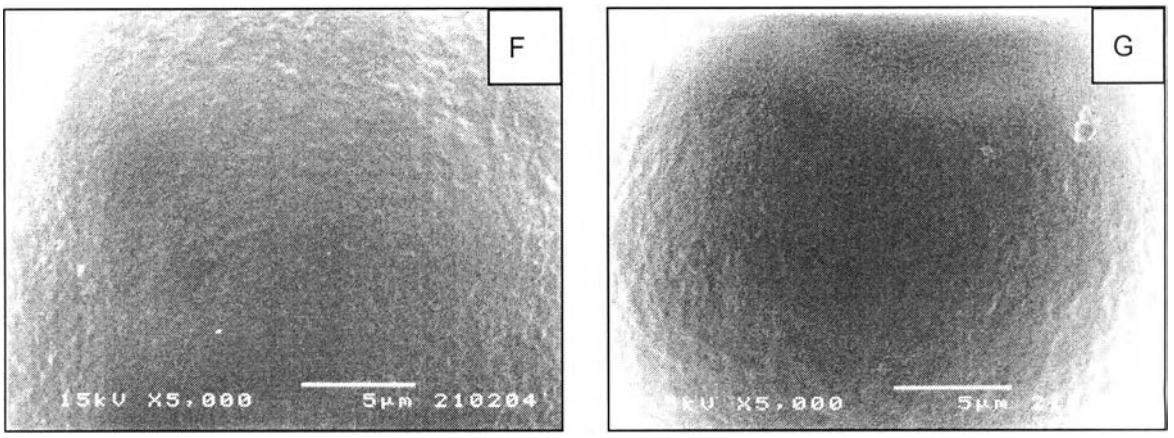
ตัวอักษร a,b,c,... ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.8 ลักษณะอนุภาคเชื้อผงถ่ายด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อมีสารละลาย MNF 10 % (A) MNF 9%+sucrose 1% (B) MNF 7%+sucrose 3% (C) MNF 5%+sucrose 5% (D) และ MNF 7%+lactose 3% (E) เป็นสารปกป้องเซลล์



รูปที่ 4.9 ลักษณะพื้นผิวอนุภาคเชื้อผงถ่ายด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope(SEM) เมื่อมีสารละลาย MNF 10% (A) MNF 9% +sucrose 1 % (B) MNF 7%+sucrose 3%(C) MNF 5% +sucrose 5% (D) MNF 9%+ lactose 1% (E), MNF 7%+lactose 3% (F) และ MNF 5%+lactose 5% (G) เป็นสารปกป้องเซลล์



รูปที่ 4.9 (ต่อ) **ภาพถ่ายลักษณะพื้นผิวอนุภาคเชื้อผงถ่ายด้วยเครื่อง** Scanning Electron Microscope (SEM) **เมื่อมีสารละลาย** MNF 10% (A) MNF 9%+sucrose 1% (B) MNF 7%+sucrose 3%(C) MNF 5%+sucrose 5% (D) MNF 9%+ lactose 1% (E), MNF 7%+lactose 3% (F) **และ** MNF5%+lactose5% (G) **เป็นสารปกป้องเซลล์**

4.3 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

4.3.1 ชนิดของสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การทำแห้ง *L. gasseri* แบบแช่เยือกแข็งที่มีสารละลาย MNF 10%+lactose 10% เป็นสารปกป้องเซลล์ ช่วยให้เชื้อมีการรอดชีวิตสูงกว่าการใช้ MNF 10%+sucrose 10% ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Abadias, *et al.*, 2001) การเสียชีวิตระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้นเกิดจากการเกิดผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการแช่แข็ง การที่น้ำเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการแช่เยือกแข็งนี้ ทำให้ตัวถูกละลายมีความเข้มข้นขึ้น นำไปสู่การเกิดแรงดันออสโมติก ซึ่งสร้างความเสียหายแก่เยื่อหุ้มเซลล์ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวคัดเลือกสารผ่านเข้าออกจากเซลล์ให้เสียสภาพปกติไป (Gomez, *et al.*, 2003 และ Monnet, *et al.*, 2003) อีกทั้งสาเหตุการเสียชีวิตของเชื้อระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้นมีรายงานการวิจัยได้แก่ Johnson and Etzel (1995) และ Abadias, *et al.* (2001) ที่กล่าวว่าโมเลกุลของน้ำ ที่จับกับส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์นั้นเกิดการแข็งตัว ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เคยจับกับโมเลกุลน้ำเดิมเปลี่ยนแปลงไปเกิดช่องว่างภายในเยื่อหุ้มเซลล์จนไม่สามารถควบคุมการไหลเข้าออกของสารภายในและภายนอกนอกได้ เซลล์สูญเสียน้ำและของเหลวที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเมทาบอลิซึมที่อยู่ภายใน Potts (1994) และ Leslie, *et al.* (1995) รายงานว่าน้ำตาลและโปรตีนซึ่งเป็น cryoprotectant จะทำหน้าที่ไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนที่เป็น hydrophilic bilayer และโปรตีนแทนโมเลกุลน้ำ ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์มีความคงตัว

ดำเนินทำหน้าที่โดยปกติของเซลล์ต่อไปได้ Zayed and Roos (2004) รายงานว่า เวลาที่ให้เซลล์สัมผัสกับสารปกป้องเซลล์ก่อนทำแห้งแต่ละครั้งต้องเพียงพอที่ให้เกิดการจับกันระหว่างโมเลกุล เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ที่ดี Ananta, Volkert and Knorr (2005) รายงานว่าการลดความเสียหายที่เกิดกับเยื่อหุ้มเซลล์นั้นจะสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้

จากการผลการทดลองพบว่าน้ำตาล lactose ทำหน้าที่เป็นสารปกป้องเซลล์ร่วมกับ MNF ได้ดีกว่า sucrose เนื่องจากน้ำตาล lactose สามารถจับกับส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่า sucrose และสารปกป้องเซลล์ชนิดหนึ่งสามารถปกป้องจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งได้ดีนั้นอาจไม่ให้ผลดีกับจุลินทรีย์อีกชนิดก็ได้ เนื่องจากสารปกป้องเซลล์มีความสามารถในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆต่างกันไป (Abadias, *et al.*, 2001) นอกจาก sucrose และ lactose จะสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตแก่เซลล์ขณะทำแห้งแบบพ่นกระจายแล้ว ยังสามารถเป็น cryoprotectant ให้แก่เซลล์ขณะทำแห้งแบบเยือกแข็งได้อีกด้วย แม้ว่าลักษณะการทำหน้าที่มีส่วนที่แตกต่างกันบ้างก็ตาม จากผลการทดลองจึงเลือก MNF10 %+lactose 10 % เป็นสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 4.9 **จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตของเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเมื่อสารปกป้องเซลล์มีองค์ประกอบแตกต่างกันแต่ปริมาณ** total solids **เท่ากัน**

สารปกป้องเซลล์	**การรอดชีวิต**^{ns} (%)
MNF10%+sucrose10%	97.17±1.57
MNF10%+lactose10%	99.00±0.16

ตัวอักษร ns หมายความว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.4 เปรียบเทียบเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายกับวิธีแช่เยือกแข็ง

เชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจายโดยให้มี total solids ของสารปกป้องเซลล์เท่ากับ 10% (w/v) อุณหภูมิลมเข้า160°C อัตราการป้อน 16 mL/min และมี MNF 7%+ sucrose 3% เป็นสารปกป้องเซลล์นั้น มีเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 97.05% ส่วนการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -60°C ความดัน 0.5 hPa เชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 99.01% ดังตารางที่ 4.10 หากนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างการทำแห้งทั้ง 2 วิธี พบว่าการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งนั้น ยังเป็นวิธีการทำแห้งที่ให้การรอดชีวิตสูงกว่าวิธีพ่นกระจาย เนื่องจากเป็นการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ เซลล์จึงเสียหายจากการทำแห้งน้อยกว่าแต่มีค่าใช้จ่ายในการผลิตแต่ละครั้งสูงกว่า (Johnson and Etzel, 1995) ผลการทดลองในตารางที่ 4.10 พบว่างานวิจัยสามารถทำแห้งเชื้อโดยวิธีพ่นกระจายให้มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้ โดยเลือกใช้ภาวะที่เหมาะสมและพัฒนาปรับปรุงกระบวนการ จึงอาจใช้การทำแห้งแบบพ่นกระจายแทนการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้จนกว่าจะมีการพัฒนาให้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้นมีค่าใช้จ่ายในการผลิตลดลง

ปริมาณความชื้นและค่า a_w ของเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายนั้นมีปริมาณต่ำกว่าการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง เนื่องจากขณะทำแห้ง อนุภาคถูกพ่นกระจายเป็นละอองฝอยพื้นที่ผิวที่น้ำระเหยออกสู่ผิวหน้าตัวอย่างมีมากกว่าการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จึงเหลือปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้นและค่า a_w ของเชื้อผงจากการทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็ง

วิธีการทำแห้ง	การรอดชีวิต (%)	ความชื้น (%)	a_w
วิธีพ่นกระจาย	97.05^{b}±0.31	1.99^{b}±0.01	0.17^{b}±0.03
วิธีแช่เยือกแข็ง	99.01^{a}±0.16	5.42^{a}±0.11	0.31^{a}±0.01

ตัวอักษร a,b ที่กำกับตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันหมายความว่าค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

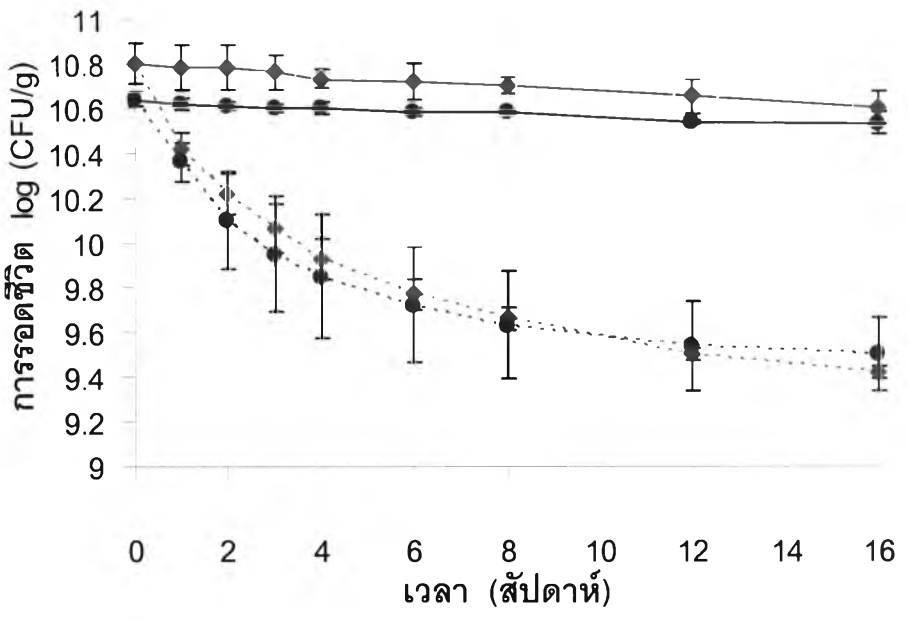
4.5 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อผงที่ทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งที่เวลาต่าง ๆ ตลอด 16 สัปดาห์

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมจากการทำแห้งทั้ง 2 วิธีแล้ว จึงทำแห้งอีกครั้งโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในขั้นต้น เพื่อผลิตเชื้อผงให้มีเพียงพอเพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อผงตลอดระยะเวลาเก็บ 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 4°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิของตู้เย็นทั่วไปที่ใช้ถนอมรักษาอาหารในครัวเรือนและ 30°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิห้องโดยเฉลี่ยของประเทศไทย เพื่อจำลองสภาวะจริงที่ผู้บริโภคสามารถเก็บรักษาได้ เมื่อผลิตภัณฑ์ออกจำหน่ายสู่ผู้บริโภคแล้วและให้นานพอที่จะเห็นแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา การเก็บนั้นได้ใช้ถุง laminated aluminium foil ประกอบด้วยชั้น PP/PE/Alu/PE/LL ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ซึ่ง Wang, *et al.*, (2004) ได้ทดลองแล้วว่าการใช้ถุง laminated ที่ประกอบด้วยชั้น Nylon/Alu/PP สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีกว่าบรรจุภัณฑ์ชนิดแก้วและขวด PET เนื่องจากถุง laminated ที่ใช้บรรจุนี้สามารถป้องกัน O_2 ความชื้นและแสงได้ดี ถึงแม้องค์ประกอบในระหว่างชั้นของบรรจุภัณฑ์ในงานวิจัยนี้จะแตกต่างกับของ (Wang, *et al.*, 2004) แต่ถือว่าใกล้เคียงกัน ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องพบว่า อัตราการรอดชีวิตของเชื้อผงที่มาจากการทำแห้งทั้ง 2 วิธี เมื่อเก็บรักษาที่ 30°C อัตราการรอดชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของการเก็บรักษาคือประมาณสัปดาห์ที่ 1-5 และจำนวนเชื้อจะค่อยๆลดลงจนเกือบคงที่ เมื่อสัปดาห์ที่ 8 และ 12 ของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและแบบพ่นกระจายตามลำดับ ดังรูปที่ 4.10 ส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษาเชื้อที่ 4°C นั้น จะช่วยชะลอการลดลงของเชื้อได้ โดยเชื้อจะลดลงอย่างช้าๆ ทำให้เชื้อเหลือรอดชีวิตจนถึงสัปดาห์ที่ 16 สูงกว่าการเก็บที่ 30°C ของการทำแห้งทั้ง 2 วิธี เนื่องจาก 4°C เป็นอุณหภูมิไม่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้อัตราเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ลดลงหรือถูกยับยั้ง ส่วนที่ 30°C นั้น เป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์คือที่ 37°C (Coeuret, *et al.*, 2004) ทำให้ที่ 30°C นั้น เซลล์มีอัตราเมทาบอลิซึมสูงกว่าที่ 4°C ซึ่งเป็นสาเหตุให้การลดลงของเชื้อสูงกว่า และในช่วงต้นของการเก็บรักษา จากรูปที่ 4.10 สัปดาห์ที่ 1-6 การลดลงของเชื้อมีอัตราสูงเนื่องจากมีเชื้อที่ได้รับบาดเจ็บระหว่างการทำแห้งในปริมาณมากจนไม่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้ต้องใช้อาหารเพื่อช่วยซ่อมแซมส่วนที่ได้รับบาดเจ็บ แต่ภาวะที่เก็บรักษาไม่เอื้ออำนวยให้เชื้อสามารถนำอาหารไปใช้ได้ ประกอบกับหากมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง (30°C) ด้วยแล้วการรอดชีวิตจะยิ่งลดลงอีกเนื่องจากเซลล์ได้รับบาดเจ็บอยู่ และยังมีอัตราเมทาบอลิซึมสูง ทำให้เชื้อที่บาดเจ็บไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ ซึ่งสอดคล้องกับในงานวิจัยของ (Teixeira, *et al.*, 1995 และ Wang, *et al.*, 2004) และจากรูปที่ 4.10 จะเห็นว่าการลดลงของเชื้อระหว่างการเก็บ

รักษาที่มาจากวิธีแช่เยือกแข็งนั้น น้อยกว่าเชื้อที่มาจากวิธีพ่นกระจาย ไม่ว่าจะเก็บที่ 30°C หรือ 4°C ก็ตาม ซึ่งเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิ 30°C โดยในวิธีแช่เยือกแข็งนั้นเชื้อลดลงจาก 10.64 log (CFU/g) เป็น 9.50 log (CFU/g) ลดลง 1.14 log (CFU/g) ส่วนการทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายนั้น เชื้อลดลงจาก 10.80 log (CFU/g) เป็น 9.42 log (CFU/g) ลดลงถึง 1.38 log (CFU/g) เนื่องจากการทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจายนั้น เซลล์ได้รับบาดเจ็บระหว่างกระบวนการสูงกว่า ส่งผลให้ในระหว่างการเก็บมีเชื้อที่บาดเจ็บสูงกว่าด้วย และในภาวะการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะทำให้เซลล์ที่บาดเจ็บไม่สามารถมีชีวิตต่อได้ (To and Etzel, 1997a)

นอกจากนี้ความชื้นสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นดังตารางที่ 4.11 เนื่องจากมีบรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันการซึมผ่านของความชื้นได้ นอกจากความชื้นที่ต่ำมากๆจะทำให้เชื้อรอดชีวิตหลังทำแห้งน้อยแล้ว ความชื้นที่สูงมากเกินไปก็มีผลทำให้เชื้อรอดชีวิตน้อยลงได้เช่นกัน โดยความชื้นที่เหมาะสมในระหว่างการเก็บรักษานั้นจะอยู่ในช่วง 2.8-5.6% (Zayed and Roos, 2004) ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์นั้นพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้ปริมาณความชื้นเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเก็บที่อุณหภูมิต่ำเล็กน้อย ส่วนวิธีการทำแห้งนั้น ไม่ว่าจะเป็นการทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจายหรือแช่เยือกแข็ง ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันมากนักซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Wang, *et al.*, 2004) ส่วนค่า a_w ของเชื้อผงนั้นไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเก็บนานขึ้น ดังตารางที่ 4.12 ถึงแม้ความชื้นจะเพิ่มขึ้นก็ตาม แตกต่างกับผลการทดลองในตารางที่ 4.3 ที่ค่า a_w เพิ่มขึ้นตามปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากค่า a_w ในตารางที่ 4.3 นั้นเป็นของผลิตภัณฑ์เชื้อผงที่มี MNF เป็นสารปกป้องเซลล์เพียงชนิดเดียว ส่วนค่า a_w ของเชื้อผงในตารางที่ 4.11 นั้นเป็นของเชื้อผงที่มีสารปกป้องเซลล์ซึ่งประกอบด้วย MNF และ sucrose ซึ่ง sucrose นั้น มีสมบัติลดค่า a_w จึงทำให้ค่า a_w ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น

การทำแห้งเชื้อในอุดมคตินั้น ไม่ว่าจะเป็นการทำแห้งโดยวิธีใด จะคาดหวังไม่ให้เชื้อเกิดการสูญเสียระหว่างการทำแห้งคือ เชื้อต้องรอดชีวิต 100 % และมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานโดยไม่เสียชีวิตหรือยังคงกิจกรรมได้ 100 % แต่ในความเป็นจริงนั้น ไม่สามารถปฏิบัติให้เป็นไปตามอุดมคติได้ เนื่องจากยังไม่มีกระบวนการผลิตใดที่จะผลิตเชื้อให้รอดชีวิตได้ 100 % และไม่สูญเสียกิจกรรมต่างๆของเซลล์ แต่สามารถลดการเสียชีวิตระหว่างการผลิตได้ โดยศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเชื้อแต่ละชนิดและป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเซลล์ระหว่างเก็บรักษาได้โดย ใช้อุณหภูมิการเก็บรักษาและบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม



รูปที่ 4.10 **ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตกับเวลาของเชื้อผง ที่ผลิตโดยวิธีพ่นกระจาย (◆)และแช่เยือกแข็ง (●) เมื่อเก็บรักษาที่** 4°C (—) **และ** 30°C (----) **เป็นระยะเวลา** 16 **สัปดาห์ ในถุง** laminated aluminium foil

ตารางที่ 4.11 ปริมาณความชื้นของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งเมื่อเก็บรักษาที่ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในถุง laminated aluminium foil

วิธีการทำแห้ง	อุณหภูมิการเก็บ (°C)	ความชื้น (%)								
		0 weeks	1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks	12 weeks	16 weeks
พ่นกระจาย	4°C	$2.80^{ns}\pm0.30$	$2.73^{ns}\pm0.39$	$2.77^{ns}\pm0.38$	$2.78^{ns}\pm0.37$	$2.82^{ns}\pm0.38$	$2.84^{ns}\pm0.36$	$2.88^{ns}\pm0.35$	$2.96^{ns}\pm0.34$	$3.03^{ns}\pm0.35$
	30°C	$2.80^{ns}\pm0.30$	$2.81^{ns}\pm0.33$	$2.86^{ns}\pm0.33$	$2.9^{ns}\pm0.34$	$2.94^{ns}\pm0.36$	$3.02^{ns}\pm0.38$	$3.75^{ns}\pm1.55$	$3.25^{ns}\pm0.43$	$3.47^{ns}\pm0.41$
แช่เยือกแข็ง	4°C	$5.04^{ns}\pm0.55$	$5.08^{ns}\pm0.50$	$5.11^{ns}\pm0.51$	$5.15^{ns}\pm0.49$	$5.20^{ns}\pm0.49$	$5.29^{ns}\pm0.44$	$5.38^{ns}\pm0.46$	$5.56^{ns}\pm0.37$	$5.77^{ns}\pm0.25$
	30°C	$5.04^{ns}\pm0.55$	$5.08^{ns}\pm0.50$	$5.12^{ns}\pm0.52$	$5.18^{ns}\pm0.46$	$5.23^{ns}\pm0.46$	$5.31^{ns}\pm0.42$	$5.43^{ns}\pm0.25$	$5.60^{ns}\pm0.28$	$5.88^{ns}\pm0.13$

ตัวอักษร ns ในแถวเดียวกันหมายความว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.12 ค่า a_w ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งเมื่อเก็บรักษาที่ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในถุง laminated aluminium foil

วิธีการทำแห้ง	อุณหภูมิการเก็บ (°C)	a_w								
		0 weeks	1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks	12 weeks	16 weeks
พ่นกระจาย	4°C	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.23^{ns}±0.03	0.23^{ns}±0.03
	30°C	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.22^{ns}±0.03	0.23^{ns}±0.03
แช่เยือกแข็ง	4°C	0.22^{ns}±0.01	0.22^{ns}±0.01	0.22^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01
	30°C	0.22^{ns}±0.01	0.22^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01	0.23^{ns}±0.01

ตัวอักษร ns ในแถวเดียวกันหมายความว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)