บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

- เชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *L. johnsonii*, *L. salivarius*, *L. gasseri* เก็บอยู่ในอาหารเหลว MRS ได้รับการอนุเคราะห์จาก (นิตยา เมธาวณิชพงศ์, 2549) และผ่านการทดสอบการทนกรด การทนน้ำดีและการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นแล้ว
- น้ำมะพร้าวแก่ ได้รับการอนุเคราะห์จากร้านขายมะพร้าวสะพานวันชาติ ถ.ประชาธิปไตย แขวงพานถม เขตพระนคร กรุงเทพมหานคร
- นมผงขาดมันเนย (milk non fat:: MNF) ตรามิชชัน ประเทศไทย
- น้ำตาลทราย ตรามิตรผล ประเทศไทย
- น้ำตาล Lactose ของบริษัท วอนเดอร์มินฟู้ดแอนด์เคมิคอล ประเทศสหรัฐอเมริกา
- บรรจุภัณฑ์ชนิด laminated aluminium foil (PP/PE/Alu/PE/LL)
บริษัทเจนจรัสซัพพลายด์ ประเทศไทย
- น้ำแข็งแห้ง บริษัท ดรายไอซ์-ไทย พลัส คอร์ปอเรชัน ประเทศไทย
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth lab grade ยี่ห้อ HI MEDIA ประเทศอินเดีย
- โพแทสเซียมไดไฮโดรฟอตเฟต lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรฟอตเฟต lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- โซเดียมอะซิเตท lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- แอมโมเนียมซิเตรท lab grade ยี่ห้อ FLUKA ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- ยีสต์สกัด lab grade ยี่ห้อ HI MEDIA ประเทศอินเดีย
- เปปโตน lab grade ยี่ห้อ MERCK ประเทศเยอรมนี
- โซเดียมคลอไรด์ lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก lab grade ยี่ห้อ FISHER CHEMICALS ประเทศอังกฤษ
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ lab grade ยี่ห้อ MERCK ประเทศเยอรมนี

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) model B30 บริษัท MEMMERT ประเทศเยอรมนี
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อควบคุมความดัน (Autoclave) model MLS-2400 บริษัท LABO ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) model E53 บริษัท WTC BINDER ประเทศเยอรมนี
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) model CH30FF200 บริษัท OLYMPUS ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) model V-530 บริษัท JASCO ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องวัด pH (pH meter) model Cyberscan pH1000 บริษัท EUTECH ประเทศสิงคโปร์
- เครื่องหมักเชื้อ (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร บริษัท BIOSTAT- B ประเทศเยอรมนี
- เครื่องวัดความหนืด (Rheometer) model C-VOR บริษัท BOHLIN ประเทศอังกฤษ
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Goniometer) model FTA100 บริษัท First Ten Angstorm ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวิเคราะห์ภาพถ่าย (Image Analizer) model Image4.5 บริษัท MEDIA CYBERNATIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องเขย่า (Shaker) model gyrotory บริษัท NEW BRUNSWICK ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องทำแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray Dryer) model DV- 2 บริษัท NIRO ประเทศเยอรมนี
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer) model dw8-85 บริษัท HETO ประเทศเดนมาร์ก
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) model JSM-5410LV บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง model pb8001 บริษัท METTER ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง model A200S บริษัท SATORIUS ประเทศเยอรมนี
- เครื่องปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศ (Vacuum Sealer) บริษัท Wabomatic model Easy-Pack
- MICROWAVE model KOR-63D7 บริษัท DAEWOO ประเทศมาเลเซีย
- Stirrer บริษัท SELECTA model agimatic-N
- Vortex mixer model 37600 mixer บริษัท THERMOLYNE
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) model E350 ยี่ห้อ MEMMERT ประเทศเยอรมนี

- เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) model Royanta Centrifugen บริษัท HETTICH ประเทศเยอรมนี
- เครื่องวัดค่า a_w (a_w analyzer) model series3 บริษัท DECAGON DEVICE model series 3 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองสำหรับเป็น starter ในการหมัก

นำแบคทีเรียชนิดต่างๆได้แก่ *L. johnsonii L. salivarius* และ *L. gasseri* ซึ่งแยกโดย นิตยา เมธาวณิชพงศ์ (2549) มาคัดเลือกให้เหลือเพียงชนิดเดียวโดยเลือกเชื้อที่เจริญได้ดีและเร็วในอาหารน้ำมะพร้าว

เริ่มจากถ่ายเชื้อแต่ละชนิดที่เก็บอยู่ในอาหารวุ้นเอียง MRS (MRS slant) ที่อุณหภูมิ 4°C ลงในอาหารน้ำมะพร้าว (เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, 2524) 10 mL ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วนาน 15 นาทีแล้ว ชนิดละ 1 หลอด บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อทุกชนิดปริมาณ 1 % (w/v) ถ่ายลงในอาหารน้ำมะพร้าว 100 mL ชนิดละ 1 flask บ่มที่ 37°C (Coeuret, Gueguen and Vernoux, 2004) เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญของเชื้อที่เวลา 0 3 6 9 11 24 30 35 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 540 nm ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้นเมื่อปริมาณเชื้อมากขึ้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสง เลือกเชื้อที่มีระยะเวลาช่วง lag phase และ exponential phase ที่สั้นที่สุด พร้อมทั้งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงนี้เป็นตัวบ่งบอกถึงจำนวนเชื้อที่ผลิตได้

3.4 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกก่อนทำแห้ง

เตรียมเชื้อโพรไบโอติกขึ้นโดยดัดแปลงจากวิธีของ Fu and Etzel (1995) เริ่มจากถ่ายเชื้อโพรไบโอติกที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากข้อ 3.3 ซึ่งเก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง MRS (MRS slant) ลงในอาหารน้ำมะพร้าว 10 mL (องค์ประกอบของอาหารแสดงไว้ในภาคผนวก ข ข้อ 2) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 2% (w/v) ลงในอาหารน้ำมะพร้าว 100 mL ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน บ่มที่ 37°C จนเข้าสู่ช่วง exponential phase สุดท้ายนำเชื้อมา 1% ถ่ายลงในอาหารน้ำมะพร้าว 4 ลิตร หมักในเครื่อง fermenter ขนาด 5 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.25 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 N และ HCl ความเข้มข้น 0.1 N ควบคุมความเร็วใบพัดกวน 100 rpm หมักที่อุณหภูมิ 37°C จนเชื้อเจริญเข้าช่วง stationary

phase ตอนต้น เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เจริญในช่วงนี้สามารถทนความร้อนได้ดีกว่าช่วง exponential phase (Teixeira, *et al.*, 1995a) ถ่ายเชื้อลงหลอด centrifuge ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 70 mL เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 4°C ความเร็วรอบ 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง centrifuge ซึ่งความเร็วรอบและเวลาของการเหวี่ยงแยกนั้นต้องควบคุมให้เท่ากันทุกครั้งเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ใน cell paste เท่ากันทุกครั้ง หลังจากนั้นจึงล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จะได้ cell paste วิเคราะห์ปริมาณความชื้นและนำเซลล์ไปทดลองขั้นต่อไป

3.5 การทำแห้งเชื้อโพรไบโอติกแบบพ่นกระจาย

3.5.1 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อการรอดชีวิตของเชื้อผงหลังทำแห้งและระหว่างเก็บรักษา

ศึกษาความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์นมผงขาดมันเนย (milk non fat:: MNF) เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุด เริ่มจากการเตรียม MNF จาก MNF ในรูปผง ให้มีความเข้มข้น 5%, 10%, 20% และ 30% (w/v) ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดความหนืดและแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Goniomter โดยใช้วิธี pendant drop method (Potschke, Piontck, and Stutz, 2002) แล้วจึงเติม cell paste ของเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 ปริมาณ 6 % ของ total solids ซึ่งมีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^9 CFU/mL เป็นปริมาณที่เหมาะสมระหว่างเชื้อและสารปกป้องเซลล์ (Lian, *et al.*, 2001) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer นับจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยใช้อาหาร MRS agar ด้วยวิธี pour plate และวัด pH ของนมผสมเชื้อเริ่มต้น หลังจากนั้นจึงป้อนตัวอย่างเข้าเครื่องทำแห้งด้วย pump พร้อมใช้ magnetic stirrer กวนขณะป้อนตัวอย่าง ให้อุณหภูมิลมเข้าเครื่องทำแห้ง 160°C ปรับอัตราการป้อน (feed rate) เป็น 34 mL/min หลังได้เชื้อผง วิเคราะห์ขนาดของ particle ด้วยเครื่อง Image analyzer นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังทำแห้งโดยใช้อาหาร MRS agar วิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคหลังทำแห้งด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM) ทดสอบความแตกต่างของสารปกป้องเซลล์แต่ละความเข้มข้นต่อจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้น ค่า a_w ด้วยเครื่อง a_w analyzer ขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Image analyzer ค่า bulk density โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และบรรจุเชื้อผงและปิดผนึกแบบสุญญากาศในถุง laminated aluminium foil ขนาด 17 cmx21 cm ซึ่งประกอบด้วยชั้น PP/ PE/ Alu/ PE/ LL หลังจากนั้นจึงเก็บรักษาที่ 20°C และ 30°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูงและเป็นอุณหภูมิที่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของเชื้อได้อย่างชัดเจนใน

ระยะเวลา 2 เดือน (Teixeira, *et al.*, 1995b) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตปริมาณความชื้นและค่า a_w เป็นเวลา 30 วัน และ 60 วัน ทดสอบความแตกต่างของสารปกป้องเซลล์แต่ละความเข้มข้นต่อจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ความชื้นและค่า a_w โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test เพื่อหาปริมาณสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด เลือกความเข้มข้นที่มีจำนวนเชื้อรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงและการลดลงของเชื้อที่มีชีวิตระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ต่ำที่สุด เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 อุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อนที่เหมาะสมขณะทำแห้งแบบพ่นกระจาย

ศึกษาอุณหภูมิลมเข้าและ feed rate เพื่อคัดเลือกอุณหภูมิลมเข้าและ feed rate ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตและปริมาณความชื้นหลังทำแห้ง เริ่มจากเตรียมสารละลาย MNF ความเข้มข้นที่ได้รับการคัดเลือกจากข้อ 3.5.1 เติม cell paste ของเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 ลงใน MNF ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาณ 6% ของ total solids MNF ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer นับจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยใช้อาหาร MRS agar ด้วยวิธี pour plate ทำแห้งที่สภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.1 เพื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิลมเข้าและ feed rate ที่แตกต่างกันที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ โดยอุณหภูมิลมเข้าที่ใช้นั้นเป็นอุณหภูมิที่ Kim and Bhowmik (1990) เคยทดลองแล้วว่าสามารถเห็นความแตกต่างของการรอดชีวิตจากผลของอุณหภูมิได้ ส่วน feed rate ที่ใช้คือ 34 และ 16 mL/min เป็นการแปรเพื่อทำให้อุณหภูมิลมออกมีค่า 80°C และ 90°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิลมออกที่ Kim and Bhowmik (1990) เคยทดลองไว้แล้วเช่นกันว่าสามารถทำให้เห็นความแตกต่างถึงการรอดชีวิตของเชื้อได้ ทำการทดลองสภาวะละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังทำแห้งโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar วิเคราะห์ความชื้นและค่า a_w โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial Design ขนาด 2x2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test เลือกภาวะที่ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยพิจารณาจากปริมาณความชื้น ≤ 5% เนื่องจากมาตรฐานอุตสาหกรรมประเภทนมผงได้กำหนดไว้ว่าความชื้นไม่เกินระดับนี้ผลิตภัณฑ์จะปลอดภัยจากการเจริญจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ตารางที่ 3.1 อุณหภูมิลมเข้าและ feed rate ที่ใช้ทำแห้ง

อุณหภูมิลมเข้า(°C)	feed rate (mL/min)
160	34
	16
180	34
	16

3.5.3 การปรับปรุงเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อขณะทำแห้ง

เมื่อได้ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์และภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมแล้วขั้นต่อไปจึงเป็นการปรับปรุงเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตให้สูงขึ้นโดยดัดแปลงให้หยดของของเหลวมีขนาดเล็กลงเพื่อลดเวลาการสัมผัสความร้อนของเชื้อ ซึ่ง Elversson (2005) ได้รายงานว่าหยดของเหลวจะเล็กลงเมื่อแรงตึงผิวลดลง ขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการศึกษาถึงสารปกป้องเซลล์สัดส่วนใหม่เพื่อให้แรงตึงผิวลดลงโดยยึดปริมาณ total solids จากข้อ 3.5.1 ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วโดยใช้สารละลายน้ำตาลปริมาณต่างๆ เป็นตัวช่วยลดแรงตึงผิว (Servulo, Reis and Almeida, 2003 และ Adhikari, *et al.*, 2007) พร้อมทั้งวัดค่าความหนืดของ สารละลาย MNF ผสมน้ำตาลเก็บไว้ประกอบการพิจารณาด้วย

3.5.3.1 ศึกษาแรงตึงผิวของ MNF ผสมน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเซลล์

เพื่อให้เชื้อรอดชีวิตสูงขึ้น จึงต้องมีการลดแรงตึงผิวของ MNF ลง สารที่นำมาช่วยลดแรงตึงผิวในงานวิจัยได้แก่ sucrose และ lactose โดยแปรสัดส่วนดังนี้คือ 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% หลังจากนั้นจึงนำมาวัดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Goniometer ใช้หลอด syringe ขนาด 3 mL และเข็มปลายตัดขนาด 22 gauge บรรจุตัวอย่างพร้อมทั้งใช้ pump เป็นตัวควบคุมการหยด บันทึกภาพขนาดของหยดตัวอย่างตั้งแต่เริ่มเป็นหยดจนกระทั่งตกพอดี โดยใช้โปรแกรม First Ten Angstorm และใช้โปรแกรมดังกล่าวคำนวณค่าแรงตึงผิวขณะที่หยดตัวอย่างตกพอดี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยค่าแรงตึงผิวจะเปลี่ยนไปตามลักษณะของหยดที่เปลี่ยนไป ทดสอบความแตกต่างของ MNF ผสมน้ำตาลแต่ละสัดส่วนต่อค่าแรงตึงผิวโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

3.5.3.2 ศึกษาความหนืดของ MNF ผสมน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเซลล์

ขนาดของหยดนอกจากจะมีอิทธิพลจากแรงตึงผิวแล้ว ยังเป็นผลอันเนื่องจากความหนืดอีกด้วย ฉะนั้นจึงต้องหาระดับของน้ำตาลทั้งสองชนิดที่เมื่อผสมเข้ากับ MNF แล้ว ต้องไม่ทำให้ความหนืดของ MNF เดิมที่วัดก่อนการผสมน้ำตาลเพิ่มขึ้น หากความหนืดเพิ่มขึ้นแล้วจะส่งผลให้ขนาดของหยดโตขึ้นกว่าเดิม ขั้นตอนการหาความหนืดนั้นทำได้โดยเตรียมตัวอย่างให้มีสัดส่วนเดียวกับข้อ 3.5.3.1 คือ 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% ควบคุมอุณหภูมิตัวอย่างให้เท่ากับ 25°C ใช้หัววัดชนิด cone and plate เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm 1 องศา ตั้งค่า shear rate เท่ากับ 272 s^{-1} และค่า gap เท่ากับ 30 μm แล้วจึง ปิเปตตัวอย่างมา 1.5 mL ลงในที่รองรับภายในเครื่อง Rheometer นำเข้าวัดความหนืด โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศในตัวอย่าง เริ่มการวัดและบันทึกค่าใช้เวลาตัวอย่างละ 5 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทดสอบความแตกต่างของ MNF ผสมน้ำตาลแต่ละสัดส่วนต่อค่าความหนืด โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อได้ค่าของแรงตึงผิวและค่าของความหนืดแล้ว จึงคัดเลือกระดับของสารละลายน้ำตาลที่สามารถลดแรงตึงผิวของ MNF ได้และไม่ทำให้ความหนืดเดิมของ MNF เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ขนาดหยดโตขึ้น เมื่อเลือกระดับของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ร่วมกับ MNF ได้แล้ว ขั้นต่อไปจึงทดลองนำอัตราส่วนของ MNF ผสมน้ำตาลทั้งหมดที่คัดเลือกมาทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจายเพื่อทดสอบสมมติฐานที่ว่า สารละลายน้ำตาลที่เพิ่มเข้ามานั้นสามารถเพิ่มการรอดชีวิตได้จริง

3.5.3.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อผงเมื่อใช้ MNF ผสมน้ำตาลเป็นสารปกป้องเซลล์

เตรียมตัวอย่างสารละลาย MNF ผสมน้ำตาลที่ได้รับการคัดเลือกเบื้องต้นจากข้อ 3.5.3.1 และข้อ 3.5.3.2 แล้วเติม cell paste ของเชื้อ ปริมาณ 6% total solids ของ feed solution ลงในสารละลาย ปริมาตร 500 mL ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer นับจำนวนเชื้อเริ่มต้น ด้วยอาหาร MRS agar โดยวิธี pour plate บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำแห้งแบบพ่นกระจาย โดยใช้อุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังทำแห้งด้วยอาหาร MRS agar เช่นการนับเชื้อเริ่มต้น วิเคราะห์ความชื้น ค่า a_w ขนาดอนุภาคและค่า bulk density ทดสอบความแตกต่างของสารละลาย MNF ผสมน้ำตาลแต่ละสัดส่วนต่อจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้น ค่า a_w ขนาดอนุภาค ค่า bulk density โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test นำตัวอย่างที่ให้ % การรอดชีวิตหลังทำแห้งสูงที่สุดเพื่อศึกษาอายุการเก็บต่อไป

3.6 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

3.6.1 ชนิดของสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

กระบวนการทำแห้งนี้ดัดแปลงจากวิธีของ (Abadias, *et al.*, 2001) เริ่มจากถ่ายเชื้อโพรไบโอติกที่ได้รับการคัดเลือกจากข้อ 3.3 ปริมาณ 6% total solids ของสารปกป้องเซลล์ลงในสารปกป้องเซลล์ได้แก่ MNF 10%+sucrose 10% และ MNF 10%+lactose 10% (w/v) ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ทำให้เชื้อรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งสูงสุดในการทดลองของ (Abadias, *et al.*, 2001) ปริมาตร 300 mL แช่เยือกแข็งเบื้องต้นก่อนทำแห้งด้วยน้ำแข็งแห้งผสมสารละลายอะซิโตน แล้วจึงนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ให้อุณหภูมิขณะทำแห้ง -60°C ความดัน 0.5 hPa ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังทำแห้งด้วยอาหาร MRS agar วิเคราะห์ความชื้นและค่า a_w เปรียบเทียบความแตกต่างของสารปกป้องเซลล์แต่ละชนิด

3.7 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อผงที่ทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งระหว่างการเก็บ 16 สัปดาห์

นำสัดส่วนของตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากข้อ 3.5.3.3 ปริมาตร 1500 mL และข้อ 3.6.1 ปริมาตร 300 mL ไปทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งตามลำดับเพื่อผลิตเชื้อผงไว้ทดสอบอายุการเก็บรักษาที่ภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมของแต่ละวิธีข้างต้น บรรจุปริมาณ 10 g ในถุง laminated aluminium foil ขนาด 17 cm x 21 cm ซึ่งประกอบด้วยชั้น PP/ PE/ Alu/ PE/ LL ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่ 4°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิของตู้เย็นทั่วไปที่ใช้ถนอมรักษาอาหารในครัวเรือน และ 30°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิห้องโดยเฉลี่ยในประเทศไทยเพื่อจำลองสภาวะจริงที่ผู้บริโภคสามารถเก็บรักษาได้ เมื่อผลิตภัณฑ์ออกจำหน่ายแล้ว (Teixeira, *et al.*, 1995) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้นและค่า a_w ที่เวลา 1 2 3 4 6 8 12 16 สัปดาห์ เพื่อให้เห็นแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาครั้งนี้ได้ ทดสอบความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ความชื้นและค่า a_w โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test