

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์นมหมัก

ผลิตภัณฑ์นมหมัก (Fermented milk products หรือ cultured milk products) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่มีการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ ที่ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก โดยหมักน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมให้เป็นกรดแลคติก และสารอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณเล็กน้อยในระหว่างกระบวนการหมักในปริมาณเล็กน้อย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก ไดอะเซทิล (Diacetyl) อะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นต้น (Tamime and Robinson, 1985, p.1 ; Nakazawa and Hosono, 1992 , p.1)

ผลิตภัณฑ์นมหมักมีต้นกำเนิดไม่แน่ชัดว่าเริ่มมีขึ้นเมื่อใด แต่เริ่มแพร่หลายมาจากดินแดนตะวันออกกลาง ชนเผ่าเร่ร่อนในแถบตะวันออกกลางสมัยโบราณที่มักทำอาชีพเลี้ยงสัตว์ เช่น วัว แพะ แกะ และอูฐ ในสมัยนั้นเมื่อรีดนมวัวแล้วไม่มีการทำความสะอาด อีกทั้งดินแดนแถบนั้นในฤดูร้อนมีอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ประกอบกับการรีดนมก็รีดด้วยมือ มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งจากอากาศ สัตว์ และจากมือคนรีดนม จึงทำให้น้ำนมที่รีดออกมาเกิดการบูดเสียได้ง่าย โดยมีรสเปรี้ยวและตกตะกอน ทำให้การขนส่งไปยังเมืองใหญ่ ๆ หรือแม้แต่การเก็บรักษาเป็นไปได้ยาก ส่งผลให้ผู้คนในแถบนั้นได้บริโภคนมสดไม่บ่อยนัก และชนเผ่าเร่ร่อนจึงต้องบริโภคน้ำนมที่ผลิตทั้งหมดเอง เหตุนี้อาจเป็นต้นกำเนิดของการทำน้ำนมให้เกิดรสเปรี้ยว จากนั้นผลิตภัณฑ์นมหมักก็แพร่หลายออกไป

Nakazawa and Hosono (1992), p.1 แบ่งผลิตภัณฑ์นมหมัก เป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

- ชนิดเซต (Set type) เช่น โยเกิร์ตชนิดเซต (Set yoghurt)
- ชนิดกวน (Stirred type) เช่น โยเกิร์ตชนิดกวนและชนิดสวิสสไตล์
- ชนิดเหลวหรือดื่มได้ (Liquid/drinking type) อาทิ นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ยาคุลท์ Ayran และ Kefir
- ชนิดแช่แข็ง (Frozen type) เช่น ไอศกรีมโยเกิร์ต (Frozen yoghurt)
- ชนิดแห้งชนิดเข้มข้นและกึ่งสำเร็จรูป (Dried/instant type) เช่น Labneh leben และ Kishk

ประเภทของนมหมักผลิตภัณฑ์นมหมัก (Fermented Dairy Products)

ผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากนํ้านมพร้อมมันเนย นํ้านมพร้อมมันเนยหางนม นํ้านมเข้มข้น หรือนํ้านมที่ผสมด้วยหางนมผง โดยจะนำมาโฮโมจิไนส์หรือไม่ก็ได้แล้วผ่านกระบวนการให้ความร้อน ทำให้เย็นลง และหมักด้วยจุลินทรีย์ (มนัสชนก สากิยะ, 2548, หน้า 3-9)

1. ประเภทของผลิตภัณฑ์นมหมักจำแนกโดยชนิดของแบคทีเรีย

สามารถจำแนกประเภทของนมหมัก โดยอาศัยแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการหมักออกได้เป็น 4 ชนิดดังนี้ (Marshall, 1984)

ผลิตภัณฑ์นมหมักบัตเตอร์มิลค์ (Cultured Butter Milk)

บัตเตอร์มิลค์ เป็นชีร์มสดซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยสด (butter) บัตเตอร์มิลค์ประกอบด้วยคุณค่าทางอาหารสามารถนำมาใช้เป็นอาหารคนหรืออาหารสัตว์ได้ การผลิตบัตเตอร์มิลค์ เริ่มจากการนำบัตเตอร์มิลค์มาพาสเจอร์ไรส์ อาจปรับไขมันในบัตเตอร์มิลค์ประมาณร้อยละ 1.7 หลังการพาสเจอร์ไรส์แล้วทำให้เย็นลงที่ 22 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมเชื้อหมักร้อยละ 1 ซึ่งเชื้อหมักประกอบด้วย *mesophilic Lactococi* เช่น *Lactobacillus lactis* ssp. *Lactis Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* และบางครั้งจะเติมเชื้อ *Leuconostoc Bacteria* เช่น *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* ด้วย นอกจากนี้อาจเติมเชื้อ *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* โดยเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ผลิตไดอะเซททิลต่ออะเซททิลได้อัตราส่วน 4 : 1 (Lindsay et. al., 1965) การควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ให้กลิ่นรสให้อยู่ในสัดส่วนที่สมดุลกัน จำเป็นต้องบ่มบัตเตอร์มิลค์ที่อุณหภูมิ 21 - 24 องศาเซลเซียส เนื่องจากถ้าใช้อุณหภูมิสูงกว่า 24 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่ผลิตกรดจะเจริญได้เร็วกว่าแบคทีเรียที่ให้กลิ่นรส มีผลให้บัตเตอร์มิลค์ที่ได้มีแต่รสเปรี้ยวแต่ขาดกลิ่นรสจำเพาะนมที่ใช้ผลิตบัตเตอร์มิลค์หมักควรมีคุณภาพดี ปริมาณกรดซิทริกในนมอยู่ระหว่างร้อยละ 0.15 - 0.19 โดยจะผันแปรไปตามฤดูกาล จึงนิยมเติมกรดซิทริกหรือโซเดียมซิเตรท เพื่อให้ผลิตภัณฑ์บัตเตอร์มิลค์มีปริมาณไดอะเซททิลที่เหมาะสม นอกจากนี้อาจเติมสารช่วยให้เกิดการคงตัว (stabilizers) สารให้ความหวาน สี นมผงหางนมผง เมื่อบ่มบัตเตอร์มิลค์นาน 14 - 16 ชั่วโมง เกิดการตกตะกอนของโปรตีนนมที่ pH 4.6 - 4.7 และได้กรดจากการไตเตรทร้อยละ 0.8 หากขาดความระมัดระวังในการเคลื่อนย้ายผลิตภัณฑ์สามารถทำให้ล้นนมแตก หลังจากได้ผลิตภัณฑ์บัตเตอร์มิลค์หมักแล้วจะลดอุณหภูมิลงมาที่ 5 องศาเซลเซียส บรรจุและจำหน่ายภายใน 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์บัตเตอร์มิลค์ที่ต้องมีลักษณะเป็นก้อนหนา มีเนื้อเนียนเรียบมีความหนืดพอสมควร และไม่มีการแยกตัวของหางนม

ลาฟฟิล (langfil) เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักของชาวสวีเดน และชาวฟินแลนด์เรียกว่า วิอิล (viili) ใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างเมือก ได้แก่ *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* และ ssp. *cremoris* ในการผลิตเพื่อให้เกิดสารที่คล้ายไกลโคโพรตีนในนม (Marshall, 1984)

ผลิตภัณฑ์นมหมักจากเชื้อแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* spp.)

ตัวอย่างนมหมักประเภทนี้ได้แก่ นมหมักของชาวบัลแกเรีย (Bulgarin) โดยจะใช้เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* นมหมักของชาวญี่ปุ่นในชื่อการค้าว่ายาคุลท์ (yakult) จะใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคท้องร่วง (Marshall, 1984)

1) ผลิตภัณฑ์นมหมักของชาวบัลแกเรีย (Bulgarian milk)

เป็นนมเปรี้ยวในตระกูลโยเกิร์ตที่มีกรรมวิธีการผลิตได้รับการถ่ายทอดมาจากนักพันธุศาสตร์ที่อพยพมาจากเอเชียเข้ามาอยู่ในบัลแกเรียประมาณคริสต์ศตวรรษที่ 5 นมหมักบัลแกเรียมีค่าความเป็นกรดสูง โดยเตรียมนมหมักบัลแกเรียเป็นการค้าใช้เชื้อหมักที่ประกอบด้วย *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* อย่างเดียวหรือใช้เชื้อผสมของ species นี้อาจเดิม *Streptococcus thermophilus* ลงไปด้วย ก่อนเดิมเชื้อต้องพาสเจอร์ไรส์นมที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ก่อน เมื่อเย็นลงจึงเติมกล้าเชื้อประมาณร้อยละ 2 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกรดแลคติกประมาณร้อยละ 1.4 อาจปล่อยไว้จนได้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงถึงร้อยละ 4 ในกรณีนี้กรดแลคติกส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป D(-) (Tamime and Deeth, 1980) จากนั้นเก็บนมเปรี้ยวไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส นมหมักบัลแกเรียเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสไม่ชวนบริโภค สารที่ให้กลิ่นรสคืออะเซทิลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว ซึ่งเกิดจากการผลิตโดย *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ในระดับความเข้มข้นถึง 12 ppm (Tamime and Robinson, 1985) ผู้ผลิตบางรายใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ร่วมกับ *Lactobacillus Lactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้หมักบัตเตอร์มิลค์

2) ยาคุลท์ (Yakult)

เป็นนมหมักที่พัฒนาในประเทศญี่ปุ่นโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ยาคุลท์ผลิตจากหางนมที่เติมน้ำตาลกลูโคสและสาหร่าย *Chlorella* ละลายในน้ำร้อน กรองฆ่าเชื้อและเติม *L. casei* ssp. *Shirota* (เป็นแบคทีเรียพบในทางเดินอาหารมนุษย์ ซึ่งแยกได้จากอุจจาระ) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จนมีเปอร์เซ็นต์กรดร้อยละ 2.7 ปริมาณของแข็งในนมต่ำกว่านมทั่วไป คือมีโปรตีนร้อยละ 1.1 จึงมีการเติมแซลคาไรด์อื่น ๆ จนทำให้ปริมาณของแข็งเพิ่มเป็นร้อยละ 14.1 ซึ่งช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี (Tamime and Robinson,

1988) เชื้อ *L. casei* สามารถผลิตสารประกอบอื่น ๆ ได้แก่ กรดซิตริก กรดซักซินิก กรดมาลิก และอะซิโตน (acetoin) ในปริมาณเล็กน้อย พบว่า ผู้ที่ดื่มยาจุลินทรีย์เป็นประจำมีความต้านทานโรคทางเดินอาหารได้ดีกว่าผู้ที่ไม่ดื่ม (Speck, 1976) ปัจจุบันมีความหลากหลายของกรรมวิธีการผลิตยาจุลินทรีย์ เพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภค เช่น การเติมน้ำผักต่าง ๆ เช่น มะเขือเทศ กระหล่ำปลี ผักชี แครอท คื่นช่าย ในส่วนผสมสำหรับนำไปหมัก (Tamime and Robinson, 1988)

ผลิตภัณฑ์นมหมักที่ใช้เชื้อ *thermophilic lactic acid bacteria* ในการหมัก

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากนมที่ผ่านความร้อนซึ่งผลิตในยุโรปตอนกลางและยุโรปตะวันออก ในฤดูร้อนอาจมีอุณหภูมิของอากาศสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กระนั้นก็ตามยังมีแบคทีเรีย 2 สปีชีส์ ที่สามารถเจริญได้ คือ *Lactobacillus delbruedkii* ssp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* แบคทีเรียทั้งสองแตกต่างกันด้านสมบัติทางกายภาพ และกิจกรรมการเมตาบอลิซึมที่ทำให้นมมีคุณค่าทางอาหาร และผลต่อสุขภาพแตกต่างกัน เช่นเดียวกับความแตกต่างในด้านสมบัติทางประสาทสัมผัส ปริมาณกรดแลคติกที่ *Lactobacillus delbruedkii* ssp. *Bulgaricus* ผลิตได้ อาจสูงถึงร้อยละ 2 - 2.5 และส่วนใหญ่อยู่ในรูป D(-) ในขณะที่ *Streptococcus thermophilus* ส่วนมากผลิตกรดแลคติกในรูป L(-) ที่จำเป็นต่อร่างกาย แต่ผลิตได้น้อยกว่าสปีชีส์แรกมาก (ผลิตได้ร้อยละ 0.6 - 0.8) (Dellaglio, 1988) *S. thermophilus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 38 - 45 องศาเซลเซียส โยเกิร์ต (yoghurt) เป็นนมหมักที่ใช้แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงที่รู้จักกันมากที่สุด

ผลิตภัณฑ์นมหมักจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียชนิด mesophilic bacteria มีหลาย species ส่วนยีสต์มักได้แก่สายพันธุ์ *Kluyveromyces* นอกจากนี้อาจมี *Candida* และ *Saccharomyces* และยีสต์สายพันธุ์อื่น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์และสภาพทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่ที่ทำการผลิต ผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการหมักคือ กรดแลคติกและเอทานอล ดังนั้นผลิตภัณฑ์นี้จึงได้ชื่อว่า นมหมักประเภทเอซิด - แอลกอฮอล์ (acid - alcohol) ผลิตภัณฑ์นี้เป็นที่นิยมในทวีปเอเชียและในตะวันออกกลาง โดยจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น ผลิตภัณฑ์ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายคือคีเฟอร์ (kefir)

1) คีเฟอร์ (Kefir)

เชื้อหมักคีเฟอร์ได้จากเมล็ดคีเฟอร์ ซึ่งอยู่ในรูปคีเฟอร์แกรน (Kefir grains) มีสีขาวจนถึงสีเหลือง มีขนาด 0.3 - 2 ซม. มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ ผิวนอกมักจะขรุขระ เกาะกันเป็นก้อนคล้ายข้าวสุก หรือคล้ายกะหล่ำหมักในถุงที่ทำด้วยหนังหรือถังไม้โอ๊คที่บรรจุนม หมักทิ้งไว้จนนมเปรี้ยว การผลิตคีเฟอร์จะผลิตคล้ายคีเฟอร์เป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกใช้เมล็ดคีเฟอร์เป็นหัวเชื้อ

(mother culture) เพื่อนำมาผลิตเป็นก๊าล้าเชื้อในปริมาณมาก (bulk starter) ในระยะที่สอง ใช้เมล็ดคีเฟอร์ตอนมในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก (Libudzisz and Piatkiewicz, 1990) เมล็ดคีเฟอร์หลังการกรองสามารถใช้เติมในนมสดเพื่อทำเชื้อหมักเก็บไว้ หรือล้างน้ำเย็นและเก็บในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หรือเก็บในสารละลายเกลือแกงร้อยละ 0.9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 8 - 10 วัน อาจเก็บเมล็ดคีเฟอร์ในสภาพแห้ง ซึ่งมีอายุการเก็บนาน 12 - 18 เดือน สัดส่วนระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ในคีเฟอร์ ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการหมัก เช่น หลังจากหมักไว้นาน 3 วัน จำนวนแบคทีเรียจะลดลง ขณะที่จำนวนของยีสต์จะเพิ่มขึ้น

เครื่องดื่มคีเฟอร์พร้อมดื่มมีลักษณะเป็นลิม เนียน สม่ำเสมอ มีสีครีม รสเปรี้ยว ซาลินเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ประกอบด้วยกรดแลคติกร้อยละ 0.8 - 0.9 ส่วนมากอยู่ในรูป L(+) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดซักซินิก (succinic acid) และกรดโพรปิโอนิก (propionic acid) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 0.08 - 0.2 เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 0.5 - 0.2 อัลดีไฮด์ชนิดต่าง ๆ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol) และอะซิโตน (acetone) ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนโคอะเซพติลซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสนั้นสร้างจากแบคทีเรียที่ใช้เกลือซิเตรท คือ *Lactobacillus lactis* ssp. *Lactis* var. *diacetylactis* และ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris* ในปริมาณ 1 ppm ในโตรเจนร้อยละ 7 อยู่ในรูปเปปโตน และร้อยละ 2 อยู่ในรูปกรดอะมิโน องค์ประกอบทางเคมีของคีเฟอร์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของนม ชนิดของธัญพืช และเงื่อนไขของเทคโนโลยี

2) คูมิส (Koumiss)

คูมิสเป็นนํ้านมเปรี้ยวที่ประกอบด้วยทั้งกรดและแอลกอฮอล์คล้ายคีเฟอร์ผลิตจากนํ้านมม้า โดยนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 - 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นก่อนเติมสตาร์ทเตอร์ 10 - 30 % สตาร์ทเตอร์ที่ใช้ประกอบด้วยแลคติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ *L.acidophilus*, *L.delbrueckii* ssp., *Bulgaricus* *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* หรือ *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (Marshall, 1984) บ่มที่อุณหภูมิ 26 - 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้กรดแลคติกและแอลกอฮอล์ตามต้องการส่วนใหญ่คูมิสจะมีปริมาณกรดแลคติก 0.6 - 1.0% และมีปริมาณแอลกอฮอล์ 0.7 - 2.5% หลังจากบ่มแล้วทำให้เย็นถึง 15 องศาเซลเซียส และกวนเพื่อให้ได้ลักษณะผลิตภัณฑ์ที่เนียนอยู่ตัวและมีอากาศผสมเล็กน้อย จากนั้นจึงบรรจุขวดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องระยะหนึ่งเพื่อให้มีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ คูมิสที่ผลิตได้จะมีลักษณะเหลว ไม่เป็นลิม (curd)

2. ผลิตภัณฑ์นมหมักจำแนกตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ ได้ดังนี้

ผลิตภัณฑ์เหลวในรูปเครื่องดื่ม (liquid product) ได้แก่ acidophilus milk sweet acidophilus milk cultured butter milk kefir และ koumiss

ผลิตภัณฑ์กึ่งแข็ง (semi - solid product) ได้แก่ cultured cream และโยเกิร์ต

ผลิตภัณฑ์เนยแข็งที่ไม่ผ่านการบ่ม (unripened soft cheese) ได้แก่ cottage cheese bakers' cheese และ quarg

3. ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์นมหมัก เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย และคุณค่าทางโภชนาการของนม

นมหมักย่อยง่ายและมีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่านมสดเนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักย่อยนมไปแล้วบางส่วนจึงทำให้ร่างกายสามารถย่อยได้ง่ายขึ้น เช่น แบคทีเรียให้กรดแลคติกมีเอนไซม์ย่อยน้ำตาลแลคโตส (β - galactosidase) มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) เป็นผลให้นมหมักมีสารอาหารโมเลกุลเล็กกว่าที่ร่างกายสามารถย่อยหรือนำไปใช้ได้มากกว่านมสด

กรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในนมหมักมีอิทธิพลต่อสมบัติทางกายภาพของตะกอนเคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีอยู่มากในนม โดยช่วยให้ย่อยได้ง่ายขึ้น เอนไซม์ในกระเพาะอาหารและตับอ่อนช่วยให้การเคลื่อนตัวของลำไส้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น ในระหว่างการเจริญของเชื้อหมักนมเปรี้ยวคีเฟอร์ (kefir) จะเกิดก๊าซ CO_2 ขึ้นในปริมาณมาก เป็นผลให้เกิดการตกตะกอนของนม กรดแลคติกในรูป L(+) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจะถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้และใช้เป็นแหล่งของพลังงาน (Gurr, 1987) สำหรับกรดแลคติกที่ร่างกายสร้างขึ้นเองจะอยู่ในรูป D(-) ถ้ากรดแลคติกชนิดนี้ถูกผลิตขึ้นในปริมาณมากจะเกิดสภาวะกรดในร่างกาย ซึ่งมีผลให้สมดุลของเกลือแร่ในร่างกายเสียไป ด้วยเหตุนี้องค์การอนามัยโลกจึงแนะนำให้ควบคุมปริมาณกรดแลคติกในร่างกายที่อยู่ในรูป D(-) ในแต่ละวันไม่ให้เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมซึ่งโดยปกติกรดแลคติกในโยเกิร์ตร้อยละ 40 - 50 จะมีกรดแลคติกในรูปน้ำน้อยกว่านี้มาก เช่น คีเฟอร์มีร้อยละ 2-5 และบัตเตอร์มิลค์ (buttermilk) มีร้อยละ 3 - 6 ดังนั้น จึงแนะนำให้ใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียในการผลิตนมหมักเพราะให้กรดแลคติกในรูป L(+) เป็นส่วนใหญ่ (Gurr, 1987)

ลดปริมาณของน้ำตาลแลคโตส

แลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในนมแลคโตสจะต้องถูกย่อยเป็นน้ำตาล ชั้นเดียวคือ กลูโคสและกาแลคโตสก่อน จึงจะสามารถดูดซึมได้โดยอาศัยเอนไซม์แลคเตสที่มีความจำเพาะจากลำไส้เล็ก ประชากรส่วนใหญ่ของโลก (ยกเว้นชาวยุโรปตอนเหนือ และประชากรในชุมชนแอฟริกันและอินเดียบางส่วน ขาดเอนไซม์แลคเตสเมื่อมีอายุมากกว่า 10 หรือ 20 ปี ปัญหานี้

เกิดขึ้นมากกับชาวตะวันออกเฉียงใต้ (Fernandes and Shahani, 1989) ผู้ที่มีปัญหาขาดเอนไซม์แลคเตสจากลำไส้เล็กมักมีอาการท้องเดิน มีแก๊สในกระเพาะมากและปวดท้องหลังบริโภคแลคโตส ทั้งนี้เกิดจากการหมักแลคโตสโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ผู้ที่มีปัญหาดังกล่าวต้องบริโภคหรือได้รับเอนไซม์ β -galactosidase จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่รอดชีวิต ซึ่งผ่านกระเพาะอาหารไปสู่ลำไส้และอาจเกิดการย่อยแลคโตสขึ้นในลำไส้เล็ก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียโยเกิร์ตไม่ทนน้ำดี จึงพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวประมาณร้อยละ 15 เท่านั้น ที่มีชีวิตรอดผ่านกระเพาะอาหารไปได้และมีเพียงร้อยละ 1 เท่านั้น ที่สามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ (Pochart et. al., 1989) อย่างไรก็ตามน้ำดีเพิ่มการดูดซึมของเซลล์แบคทีเรียเป็นผลให้แบคทีเรียที่รอดชีวิตมีประสิทธิภาพในการย่อยแลคโตสได้เร็วขึ้น

เพิ่มการดูดซึมของเกลือแคลเซียมและธาตุเหล็ก

การหมักมีผลต่อปริมาณเกลือแร่ในนมหมักเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามคุณค่าทางอาหารมิได้ขึ้นอยู่กับว่าในอาหารจะมีธาตุอาหารมากเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการนำธาตุอาหารเหล่านั้นไปใช้ การดูดซึมของแคลเซียมจะดีขึ้นถ้ามีแลคโตสประกอบด้วย (Rusoff, 1987) ในกรณีของผู้สูงอายุที่มีความต้องการแคลเซียมเพิ่มขึ้น การหลั่งน้ำย่อยจากกระเพาะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การบริโภคนมหมักจะช่วยเพิ่มการละลายและการดูดซึมของแคลเซียมและเหล็กสืบเนื่องจากความเป็นกรดของกระเพาะอาหารลดลง

ควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร

ในผลิตภัณฑ์นมหมักมีสารเมตาบอไลต์ที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียขับออกมาสะสมสารเหล่านี้มีสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอรั่มิก และกรดเบนโซอิก มีความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้แลคติกแอซิดแบคทีเรียยังผลิตสารที่มีสมบัติทางปฏิชีวนะ เรียกว่า Bacteriosin สามารถยับยั้งแบคทีเรียในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Salmonella* หรือ *Shigella* ด้วย (Daeschel, 1993) ไนซินส์ (nisins) เป็นสารปฏิชีวนะจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวที่ US.FDA ขอมให้ใช้เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารได้ (21 CFR.Part. 178) แลคติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิดสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ยับยั้งแบคทีเรียจำพวก *Clotridia* *Staphylococci* และ *Psychrotrope* บางชนิดได้ นอกจากนี้ปัญหาจากการมีเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ไม่สมดุลในลำไส้ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะสามารถแก้ไขได้โดยการดื่มนมหมัก แต่การที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายในร่างกายนั้น ลำดับแรกแบคทีเรียชนิดนี้ต้องมีชีวิตรอดหลังผ่านกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ตามปกติคนหมักใช้

เวลาผ่านกระเพาะอาหารค่อนข้างสั้นคือประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง pH อาจลดลงมาต่ำถึง 1.5 แต่หลังจากบริโภคอาหารเข้าไปแล้ว pH อาจเพิ่มขึ้นถึง 4 - 5 แลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถทนกรดได้แตกต่างกัน จึงมีความสามารถรอดชีวิตหลังผ่านกระเพาะอาหารได้ต่างกัน

ยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งและกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน

แลคติกแอซิดแบคทีเรียมีกลไกซึ่งเชื่อว่าสามารถด้านการเกิดมะเร็งบางชนิดได้โดยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับเซลล์มะเร็งโดยตรงหรือกำจัดเซลล์ที่จะกลายเป็นเซลล์มะเร็งต่อไปจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ปรากฏว่าแลคโตบาซิลลัสบางพันธุ์สร้างเอนไซม์ที่มีสมบัติลดไนโตรที่ ทำให้ปริมาณไนโตรที่มีอยู่ในอาหารลดน้อยลง จึงลดความเสี่ยงจากไนโตรซามีนส์ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และยังมีคุณสมบัติลดระดับเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปจากโปรคาร์ซิโนเจน (procarcinogens) ไปเป็นคาร์ซิโนเจน (carcinogens) จึงเป็นการลดความเสี่ยงของการเกิดเซลล์มะเร็งอีกทางหนึ่ง โดยปกติแบคทีเรียในลำไส้สร้างเอนไซม์ 3 ชนิด คือ azoreductase, β -galactosidase และ nitoreductase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามกระตุ้นการเปลี่ยนรูปของโปรคาร์ซิโนเจนไปเป็นสารคาร์ซิโนเจน (ทำให้เกิดโรคมะเร็ง) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า เร่งการเกิดโรคมะเร็ง ได้มีการศึกษาพบว่าการบริโภคนมที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จะทำให้ระดับเอนไซม์ทั้งสามในอุจจาระลดลงประมาณ 2 ถึง 4 เท่า โดยการทดลองนี้ใช้นมอะซิโดฟิลัสที่ผลิตเป็นการค้า (Goldin and Gorbach, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lb. delbrueckii* ssp. *bugaricus* และแบคทีเรียจำพวกบีฟิโดแบคทีเรีย มีอิทธิพลต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชักนำให้เกิดสารแอลฟาอินเทอเฟอรอนขึ้น สารนี้ทำหน้าที่ต่อต้านไวรัสและการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์แปลกปลอม จึงมีสมบัติเป็นผู้ทำลาย (killer cells) (Simone et. Al. 1989)

ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

สมบัติในการลดโคเลสเตอรอล ความเสี่ยงเกี่ยวกับโรคหัวใจ และระดับโคเลสเตอรอลในเลือดมีความสัมพันธ์กัน ป้องกันได้โดยการควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด ซึ่งการบริโภคนมหมักช่วยลดระดับของโคเลสเตอรอลในเลือด (Mann and Spoerry, 1974) แบคทีเรีย *lactobacillus acidophilus* สายพันธุ์หนึ่งสามารถใช้โคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในสภาวะไร้อากาศที่มีเกลือน้ำดี (Gilliland et. Al., 1985) อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการทนเกลือ น้ำดีกับการใช้โคเลสเตอรอลแบคทีเรีย (Gilliland and Walker, 1990) ผลของแบคทีเรียแลคติกในการลดระดับโคเลสเตอรอลยังไม่ชัดเจน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (Marteau and Rambaud, 1993)

คีเฟอร์แกรน (Kefir grain)

คีเฟอร์แกรนเป็นก้อนเชื้อผสมระหว่างแลคติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวประเภทโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส(คีเฟอร์ัน) เชื้อผสมนี้มีลักษณะเป็นก้อนเมือกตะปุ่มตะป่ำคล้ายดอกกระหล่ำ มีสีขาว ขนาดตั้งแต่ 5-20 มิลลิเมตร เมื่ออยู่ในน้ำนม คีเฟอร์แกรนสามารถเพิ่มจำนวนและขนาดได้ ซึ่งโดยทั่วไป จะมีขนาดเท่ากับเมล็ดถั่ว ในขณะที่เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ไปด้วย ดังนั้นคีเฟอร์แกรนจึงเป็นเสมือนเชื้อผสมที่ตรึงตัวเองอยู่บนก้อนเมือก ทำให้สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อได้อย่างต่อเนื่องไม่สิ้นสุด

การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์แกรน พบว่าจุลินทรีย์ที่อยู่ในคีเฟอร์แกรนประกอบด้วยยีสต์และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย การศึกษายีสต์ที่แยกจากคีเฟอร์แกรนมีรายงานไว้ต่าง ๆ กันโดย La Riviere (1963) พบ *Torulopsis holmii* และ *Saccharomyces delbrueckii* ในอัตราส่วนประมาณ 10:1 ยีสต์สองชนิดนี้มีประมาณ 1.4 ถึง 3.3×10^8 เซลล์ต่อกรัมของก้อนเชื้อ Iwasawa และคณะ (1982) พบว่า *Saccharomyces exiguous* เป็นยีสต์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในคีเฟอร์แกรน นอกจากนั้นยังมีรายงานการพบ *Candida* (*Torula*) *kefir* และ *Candida pseudotropicalis* ในคีเฟอร์แกรนจากแหล่งอื่น ๆ สำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียในส่วนใหญ่นั้นได้แก่ *Lactobacillus* spp. โดยพบ *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. ประมาณร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ โดยมีรายงานการศึกษาในช่วงแรก ๆ ว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) ได้แก่ *Lactobacillus brevis* (ATCC 8007) เป็นแลคโตบาซิลลัสที่พบมากและมีบทบาทสำคัญในการสร้างเมือกคีเฟอร์ัน อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาต่อมามากหลายรายงานด้วยกัน ที่พบว่าแลคโตบาซิลลัสซึ่งมีอยู่มากในคีเฟอร์แกรน เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่พบเฉพาะในก้อนเชื้อผสมชนิดนี้ และให้ชื่อว่า *Lactobacillus kefirifaciens*

นอกจากนี้การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์แกรนมีความสมดุลโดยธรรมชาติถึงแม้ว่าการหมักคีเฟอร์จะมีได้ใช้เทคนิคทำให้ปลอดเชื้อ ก็จะไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออื่น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) เนื่องจากยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกไม่สามารถใช้น้ำตาลในนมได้ จึงต้องอาศัยสารอาหารที่สังเคราะห์โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียในขณะที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียต้องพึ่งพาสารเสริมการเจริญ (Growth factor) ที่สลายจากเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว

คุณสมบัติเฉพาะที่น่าสนใจของก้อนเชื้อคีเฟอร์แกรน จำแนกเป็น (Cheirsilp *et al.*, 2003)

1. เชลล์ในก้อนเชื้อสามารถเพิ่มขนาดและจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงมีเชลล์อยู่ในก้อนเมือก
2. โดยปกติก้อนเชื้อสามารถเกิดการหมักได้เป็นเวลานาน ถ้าอยู่ในสภาวะเพาะเลี้ยงเช่นเดิม
3. ถึงแม้ว่าสภาวะที่ใช้ในการหมักจะไม่ได้ปลอดเชื้อ แต่จะไม่พบการปนเปื้อนในการหมักด้วยเหตุผลที่ไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะเนื่องมาจากการที่เชื้อตรึงตัวคล้ายห่อหุ้มตัวเองนั้นส่งผลให้เชลล์มีระบบป้องกันและสามารถดำเนินบทบาทตัวเองต่อไปได้

4. การอยู่ร่วมกันของเชลล์ยีสต์และแบคทีเรียในก้อนเชื้อ ส่งผลให้เกิดกระบวนการหมักที่น่าสนใจ สารที่ได้จากการหมักมีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถแสดงให้เห็นได้ว่าแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในก้อนเชื้อผสมนี้มีทั้งพวกที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น (Short rod) และแท่งยาวโค้ง (Curved rod) ซึ่งส่วนใหญ่จะตายและผนังเชลล์ย่อยสลายแล้ว โดยที่แบคทีเรียรูปร่างแท่งยาวนี้จะฝังตัวอยู่ในส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (ย้อมติดสี Ruthinium red) เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของกล้าเชื้อผสมชนิดนี้ พบว่าก่อนที่กล้าเชื้อจะมีลักษณะเป็นก้อนเหมือนดอกกะหล่ำนั้น เชื้อจะอยู่รวมกันในลักษณะเป็นแผ่นซึ่งมีด้านหนึ่งเรียบและอีกด้านขรุขระ เมื่อเลี้ยงในน้ำนมมานานขึ้น แผ่นเชื้อนี้จะม้วนตัวเข้าหากันเรื่อย ๆ จนเป็นก้อน โดยด้านที่เรียบของแผ่นเชื้อประกอบไปด้วยแบคทีเรียแท่งสั้น ส่วนด้านขรุขระจะมีทั้งยีสต์และแบคทีเรีย ส่วนแบคทีเรียที่เป็นแท่งยาวโค้งจะฝังตัวอยู่ในสารเมือก ซึ่งแบคทีเรียแท่งยาวดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่เชลล์จะเกิดการสลายแล้ว (Autolyze) จึงเป็นที่เชื่อว่าแบคทีเรียที่ฝังตัวอยู่นี้มีบทบาทในการสังเคราะห์สารเมือก (คีเฟอร์ิน) (Marshall *et al.*, 1984)

คุณสมบัติของคีเฟอร์ิน

มีสารพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่ผลิตได้ในพืชชั้นสูง รา ยีสต์ และพบว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ ซึ่งคีเฟอร์ินเป็นเอ็กโซโพลิแซ็กคาไรด์ อีกชนิดที่พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านมะเร็ง (Antitumor) สามารถนำมาผลิตยารักษาโรคมะเร็งได้ ทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นสารช่วยบำรุงร่างกายอีกด้วย (Shiomi *et al.*, 1982)

Rodrigues และคณะ (2004) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสาร Antimicrobial agent ในสารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอร์ิน และผลการสมานแผลติดเชื้อจาก *Staphylococcus aureus* ในหนู Wistar พบว่า หนูในกลุ่มที่ใช้ Kefir gel ความเข้มข้นร้อยละ 70 จะสามารถลดอาการอักเสบและสมานแผลให้เชื่อมติดกันภายใน 7 วันได้ และให้ผลการสมานแผลได้ดีกว่าหนูในกลุ่มที่สมานแผลด้วย neomycin – clostebol emulsion ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และยังศึกษาผลการใช้สาร

สกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอร์นในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus* และ *Escherichia coli*

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอร์นในอาหารสัตว์ พบว่าสัตว์ในกลุ่มทดลองจะตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของตัวเองได้ดีขึ้น และสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลให้ต่ำลงและมีอาการติดเชื้อลดลง

Santos และคณะ (2003) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial) ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์ โดยทำการทดสอบกับ Caco – 2 cells ซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์ในลำไส้มนุษย์มีความทนกรด และทนเกลือได้ดีผลการทดลองพบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Salmonella typhimurium* ใน Caco – 2 cells ได้โดย *Lactobacillus acidophilus* CYC 10051 และ *Lactobacillus kefiranofaciens* CYC 10058 ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า *L. kefiranofaciens* CYC 10058 ที่แยกได้มีความสามารถในการผลิตคีเฟอร์นและคีเฟอร์นที่ผลิตได้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งอีกด้วย

ในทางอุตสาหกรรมอาหาร ได้มีการพัฒนาคีเฟอร์นเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม โดยใช้เป็นสารเพิ่มความหวาน นอกจากนี้ยังพบว่าคีเฟอร์นสามารถนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียว สารทดแทนไขมัน และใช้เป็นสารอ้วนน้ำได้เป็นอย่างดี และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต ได้มีการเติมคีเฟอร์นลงไปเป็นส่วนผสมของสารให้ความหวาน ซึ่งทางการแพทย์พบว่าสามารถตอบสนองต่อระบบ Immune response system ของร่างกายช่วยให้เกิดความผ่อนคลายในคนที่เกิดอาการเครียดได้ (Kobayama et al., 1997 and Cheirsilp et., 2003)

หลักการทำแห้งแบบระเหิด (freeze drying)

การทำแห้งแบบระเหิด (freeze drying หรือ lyophilization) อาศัยการทำให้น้ำในอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่ทดลองอยู่ในสภาวะเยือกแข็ง (freezing) ก่อนมีผลทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นลักษณะสม่ำเสมอแบบเดียวกัน (uniformity) ทั่วทั้งชิ้น จากนั้นจึงผ่านกระบวนการระเหิดน้ำที่อยู่ในสภาพน้ำแข็งให้กลายเป็นไอโดยตรงไม่ผ่านสถานะของเหลว (sublimation) ที่ความดันไอและอุณหภูมิที่ผิวหน้าน้ำแข็งมีค่าต่ำกว่าจุดสมดุลของสภาวะก๊าซ ของเหลว ของแข็ง ซึ่งเรียกว่า triple point (ประมาณ 0.06 atm และ 0 องศาเซลเซียส) จะส่งผลทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์จะเป็นรูพรุนสม่ำเสมอทั่วทั้งชิ้น (Hammami และ Rene, 1997)

ในกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดจะเกิดการถ่ายเทความร้อนและมวล โดยการถ่ายเทความร้อนนั้นเกิดจากผิวหน้าของอาหารและผ่านชั้นของผลิตภัณฑ์ไปยังบริเวณของการระเหิด น้ำที่

ระเหิดไปจากผิวหน้าของน้ำแข็งจะต้องใช้พลังงาน ซึ่งมีค่าเท่ากับความร้อนแฝงของการระเหิดของน้ำ จากนั้นเกิดการถ่ายเทจากแหล่งให้ความร้อนไปยังบริเวณการระเหิดภายในชั้นผลิตภัณฑ์และไอน้ำที่เกิดขึ้นจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องควบแน่น (condenser) และการถ่ายเทมวลที่อัตราการทำแห้งแบบระเหิดปานกลางพบว่าน้ำแข็ง 1 กรัม ระเหิดให้ไอน้ำประมาณ 1 ลูกบาศก์เมตรที่ความดัน 1 torr ไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดถูกถ่ายเทไปยังผิวหน้าของผลิตภัณฑ์แล้วจึงถูกถ่ายเทออกจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์

ขั้นตอนของการทำแห้งแบบระเหิด

ในกระบวนการผลิตนี้จึงประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1. การทำให้วัตถุดิบอยู่ในสถานะแช่เยือกแข็งโดยอาจใช้วิธี cryogenic freezing เป็นการนำตัวอย่างจุ่มในโตรเจนเหลวหรือคาร์บอนไดออกไซด์เหลวที่บรรจุอยู่ในภาชนะที่เป็นสแตนเลส หุ้มฉนวนหรือใช้การพ่นในโตรเจนเหลวลงบนผลิตภัณฑ์โดยตรง หรืออาจใช้ air blast freezer ก็ได้ การแช่แข็งด้วยวิธี cryogenic freezing จะทำให้เกิดผลเสียต่อเนื้อสัมผัสน้อยกว่าวิธีแช่แข็งโดยใช้ air blast freezer อัตราการแช่แข็งอาจจะส่งผลต่อคุณสมบัติในการคุดน้ำกลับของผลิตภัณฑ์ที่แห้งเนื่องจากลักษณะของรูพรุนที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปอัตราการแช่แข็งที่เร็วจะทำให้เกิดรูพรุนขนาดเล็กกว่าอัตราการแช่แข็งที่ช้า หลังจากผลิตภัณฑ์อยู่ในลักษณะเยือกแข็งแล้ว

2. การทำแห้งแบบระเหิดแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนย่อย (จรัสกริ เทียงธรรม, 2544) คือ

2.1 การทำแห้งขั้นต้น (primary drying) หลังจากการแช่เยือกแข็งแล้ว ความดันย่อยของความดันไอน้ำจะลดลงต่ำกว่าจุด triple point และไอน้ำจะเกิดการระเหิดขึ้น ในระหว่างการทำแห้งขั้นต้น ปัมสุญญากาศจะนำเอาไอน้ำซึ่งไม่ควบแน่นออกมา ไอที่ไม่ควบแน่นนี้จะเกิดขึ้นระหว่างการถ่ายเทไอขั้นแรกของระบบ และในระหว่างการทำแห้งแรงขับเคลื่อนซึ่งทำให้เกิดการระเหิดในระหว่างการทำแห้งขั้นต้น คือ ความแตกต่างของความดันระหว่างผลิตภัณฑ์และคอนเดนเซอร์ ซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิ โดยปกติแล้วถ้าอุณหภูมิน้ำลดลง ความดันไอของน้ำจะลดลงด้วย สำหรับการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งให้ได้ผลนั้นอุณหภูมิของคอนเดนเซอร์จะต้องต่ำกว่าอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ ซึ่งความแตกต่างของอุณหภูมินี้จะทำให้เกิดความดันต่างกัน ไอน้ำทั้งหมดจึงเคลื่อนที่จากผลิตภัณฑ์ไปยังคอนเดนเซอร์ แต่ถ้าอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าอุณหภูมิของคอนเดนเซอร์ ไอน้ำจะไหลย้อนกลับไปยังผลิตภัณฑ์

2.2 การทำแห้งขั้นที่สอง (secondary drying) การทำแห้งขั้นนี้เป็นการระเหิดน้ำออกจากผลิตภัณฑ์จนผลิตภัณฑ์มีความชื้นเหลืออยู่ต่ำกว่า 20% โดยน้ำหนัก (w / w) ซึ่งเป็นการระเหิดน้ำที่อุณหภูมิในช่วง 20-40 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ปัมสุญญากาศจะทำการลดความดันเพื่อแยกตัวทำละลายออกไป จากนั้นคอนเดนเซอร์จะดักไอน้ำของตัวทำละลายที่ระเหิดออกจาก

ผลิตภัณฑ์ โดยการควบแน่นให้กลายเป็นน้ำแข็งที่ขดลวดของคอนเดนเซอร์ ในขั้นตอนการทำแห้งนี้จะไม่มีการเคลื่อนที่ของน้ำจากกึ่งกลางขึ้นไปยังผิวหนังในระหว่างกระบวนการระเหิดชั้นน้ำแข็งลดลงจากผิวหนังไปหาจุดกึ่งกลางเหลือแต่ช่องว่างเดิมที่เคยมีน้ำแข็งแทรกอยู่

โดยเมื่อกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดเสร็จแล้วจะพบว่าอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จะเท่ากับอุณหภูมิของภาชนะให้ความเย็น แสดงว่าไม่มีการถ่ายเทความร้อนเกิดขึ้นระหว่างผลิตภัณฑ์และชั้นให้ความเย็น คอนเดนเซอร์จะมีอุณหภูมิลดลงตามเดิมโดยไม่สามารถควบแน่นไอน้ำออกมาจากผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณที่มากพอจะทำให้อุณหภูมิกอนเดนเซอร์นั้นสูงขึ้นและความดันภายในระบบจะมีค่าปกติเหมือนเดิม แสดงถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลไอน้ำมีค่าลดลงอย่างมาก

ข้อดีของการทำแห้งแบบระเหิด (Strashun and Talburt, 1954; Ammu et al., 1977)

1. ผลิตภัณฑ์ได้รับความเสียหายระหว่างกระบวนการทำแห้งน้อยที่สุดเนื่องจากใช้อุณหภูมิต่ำ
2. ผลิตภัณฑ์แห้งที่ดีมีลักษณะเป็นรูพรุนทำให้การคืนรูปได้ง่าย
3. สามารถคงรสชาติ กลิ่น ในผลิตภัณฑ์ได้มาก

ข้อเสียของวิธีการทำแห้งแบบระเหิด

1. ผลิตภัณฑ์มี bulk density ต่ำและมีสมบัติ hygroscopic มากจึงทำให้มีการจับตัวเป็นก้อน (cake) ได้ง่าย
2. ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำและระดับสุญญากาศที่สูง จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ทางการค้า (Ammu et al., 1977)

สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants, suspending fluids)

การเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) นั้นจะสามารถรักษาเชื้อให้รอดชีวิตได้เป็นระยะเวลายาวนาน และสะดวกในการจัดส่งเชื้อไปยังแหล่งที่ต้องการใช้ศึกษาและวิจัย รวมทั้งสามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นจำนวนมากอีกด้วย โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการนี้เก็บรักษาเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์และรา และอาจใช้เก็บสาหร่าย โปรโตซัวและไวรัสได้บางจำพวกเท่านั้น สิ่งจำเป็นที่ต้องใช้ในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งนอกเหนือจากปั๊มดูดอากาศ และเครื่องทำความเย็นแล้ว การใช้หลอดบรรจุเชื้อตามขนาดที่เหมาะสมและการเลือกใช้สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants หรือ protective substances) ที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละประเภทจะสามารถทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้นานแตกต่างกัน สารประกอบที่นิยมใช้เป็นตัวเคลือบเซลล์หรือป้องกันเชื้อจากความเย็นและอันตรายอื่น ๆ ระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งนี้ ได้แก่

สคิมมิลค์ น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล (glycerol) โซเดียมกลูตาเมต (sodium glutamate) หรือส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสกับซีรัม (สมบุญ ธนาสุวัฒน์, 2544 หน้า 15)

กลไกการทำงานของสารป้องกันความเย็นจากการแช่เยือกแข็ง

1. การเพิ่มความแข็งแรงของพันธะภายในโมเลกุลของโปรตีน (นิรมล ลิธิระ, 2547 หน้า 12-15)

ในระหว่างการแช่เยือกแข็งพันธะที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งเป็นพันธะที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน อ่อนแอลง ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการคลายตัว (unfolding) และเสียสภาพได้ง่าย การเติมสารป้องกันความเย็นในการแช่เยือกแข็งสามารถเพิ่มความแข็งแรงของพันธะที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนได้ Gekko and Morikawa (1981) พบว่ากลีเซอรอลสามารถเพิ่มความคงตัวของโมเลกุลของโปรตีนได้ เนื่องจากกลีเซอรอลประกอบด้วยหมู่ที่มีขั้วถึง 3 หมู่ สามารถละลายน้ำและจับกับหมู่ที่มีขั้วบนผิวหน้าของโมเลกุลของโปรตีนได้ดีจึงผลักหมู่ที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลของโปรตีนเข้าสู่ด้านใน การคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนจึงเกิดขึ้นได้ยาก

2. การลดจุดเยือกแข็ง (freezing-point depression)

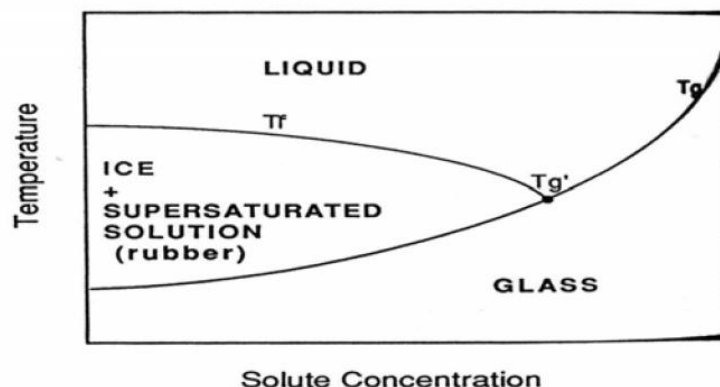
การเกิดผลึกน้ำแข็งเป็นสาเหตุหนึ่งที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งจุลินทรีย์ เนื่องจากในระหว่างกระบวนการเกิดผลึกน้ำแข็ง น้ำอิสระและน้ำที่จับกับโมเลกุลของโปรตีนจะเคลื่อนที่มารวมกับนิวเคลียสน้ำแข็ง ทำให้นิวเคลียสน้ำแข็งโตขึ้นเรื่อยๆ ทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการสูญเสียและความเข้มข้นของตัวถูกละลายและไอออนเพิ่มสูงขึ้น การเติมตัวถูกละลายสามารถลดจุดเยือกแข็งของอาหารได้ เนื่องจากคุณสมบัติ colligative คือตัวถูกละลายที่เติมลงไปจะไปรบกวนการเกิดผลึกน้ำแข็ง จุดเยือกแข็งของอาหารจึงต่ำลง (McDonald and Lanier, 1991) โดยเฉพาะการเติมสารที่มีโมเลกุลเล็กลงในอาหารสามารถลดจุดเยือกแข็งของอาหารลงได้ดีกว่าการเติมสารโมเลกุลใหญ่ เนื่องจากสารโมเลกุลเล็กมีจำนวนอนุภาคต่อน้ำหนักมากกว่าสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ทำให้มีคุณสมบัติลดจุดเยือกแข็งของอาหารได้ดีกว่า

3. การเกิดสถานะเสมือนแก้ว (glassy state)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในอาหารแช่เยือกแข็งเป็นแบบ diffusion limited deterioration reaction การเติมสารป้องกันความเย็นเนื่องจากการแช่เยือกแข็งที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล โทเลอแซนหรือกลูโคสไซรัป ไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของน้ำ ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียของอาหารจึงเกิดได้ช้าลง นอกจากนี้การเกิดสถานะเสมือนแก้ว (glassy state) ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อาหารแช่เยือกแข็งมีความคงตัวในระหว่างเก็บซึ่งสามารถอธิบายได้จากภาพ 1 ที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายต่ำกว่าจุด T_g' และอุณหภูมิลดลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (T_f) จะเข้าสู่ช่วงที่เรียกว่า rubber state

ช่วงนี้สารละลายมีความอิ่มตัวยิ่งยวด (viscous supersaturated solution) ร่วมกับการเกิดผลึกน้ำแข็ง ทำให้สารละลายมีความหนืดสูงและเกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้

เนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งทำให้ความเข้มข้นของไอออนและตัวถูกละลายเข้มข้นขึ้น ไปคั่งน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมา โมเลกุลของโปรตีนจึงรวมตัวกันและเสียสภาพได้ ในขณะที่การลดอุณหภูมิ ของอาหารที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงมากกว่า T_g' จะเข้าสู่ช่วงสถานะเสมือนแก้ว ซึ่งช่วงนี้จะมีการสร้างพันธะระหว่างน้ำกับโมเลกุลของโปรตีน เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า amorphous ทำให้อาหารมีความหนืดสูงมากประมาณ 104 Pa.sec และน้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จึงเกิดปฏิกิริยาเคมีดำและ โปรตีนไม่เสียสภาพ (McDonald and Lanier, 1991) การเติมคาร์โบไฮเดรตน้ำหนักรวมโมเลกุลสูงลงไปจะเพิ่มอุณหภูมิในการเกิดสถานะเสมือนแก้ว เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลสูงมีขนาดโมเลกุลใหญ่ จึงขัดขวางการเคลื่อนที่ของน้ำ ทำให้อาหารมีความหนืดสูงขึ้น อุณหภูมิที่เกิดสถานะเสมือนแก้วจึงสูงขึ้น (Levine and Slade, 1988) Hsu et al. (2003) พบว่าอุณหภูมิในการเกิดสถานะเสมือนแก้วของสตาร์ชข้าวที่มีความชื้น 11.2% คือ -7.5°C ซึ่งสูงกว่าสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 70% และ 30% คือ -64.6°C และ -32.7°C ตามลำดับ



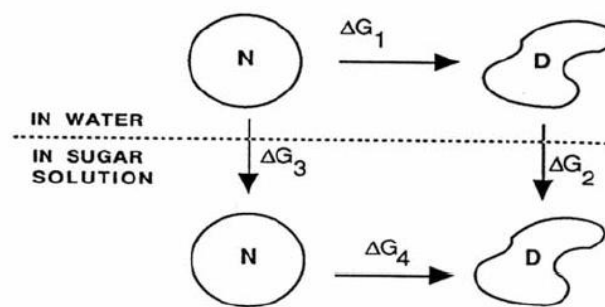
ภาพ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวถูกละลายกับการเกิด glassy state และ rubber state

ที่มา : Levine and Slade (1988)

1.4. การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระกิบส์

กลไกในการป้องกันความเย็นของคาร์โบไฮเดรตน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ สามารถอธิบายได้ในรูปของพลังงานอิสระกิบส์ (Gibbs : G) พลังงานอิสระกิบส์เป็นค่าที่แสดงว่าปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้เองหรือไม่ เนื่องจากตามธรรมชาติระบบพยายามเปลี่ยนไปสู่สภาวะที่มีพลังงานต่ำกว่า

เสมอ ทำให้ค่า ΔG เป็นลบ ปฏิกริยาที่มีค่า ΔG ต่ำกว่าจึงเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าปฏิกริยาที่มีค่า ΔG สูง จากภาพ 2 ซึ่งแสดงค่า ΔG ของการเสียสภาพของโปรตีนในน้ำและสารละลายน้ำตาล พบว่า $\Delta G_1 + \Delta G_2 = \Delta G_3 + \Delta G_4$ จากการทดลองของ Arakawa and Timasheff (1982) พบว่า ΔG_2 ซึ่งแสดงถึงผลต่างระหว่างพลังงานอิสระกิบส์จากโปรตีนที่เสียสภาพในน้ำไปสู่ความเย็นในสารละลายน้ำตาลมีค่ามากกว่าค่า ΔG_3 ซึ่งแสดงถึงผลต่างระหว่างพลังงานอิสระกิบส์ของโปรตีนรูปธรรมชาติ (native) ในน้ำไปสู่โปรตีนรูปธรรมชาติในสารละลายน้ำตาล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า $\Delta G_4 > \Delta G_1$ แสดงว่าการเสียสภาพของโปรตีนในสารละลายน้ำตาลเกิดขึ้นได้ยากกว่าการเสียสภาพของโปรตีนในน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมคาร์โบไฮเดรตน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงไป ทำให้น้ำจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง ทำให้โปรตีนมีความคงตัวมากขึ้น (McDonald and Lanier, 1991)



ภาพ 2 การเปลี่ยนจากรูปธรรมชาติ (Native : N) ไปสู่รูปเสียสภาพ (Denature : D) ของโปรตีน
ในน้ำและสารละลายน้ำตาลซูโครส

ที่มา : Arakawa and Timasheff (1982)

การรอดชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่ทำแท้งนั้น ส่วนประกอบที่เป็นโครงสร้างเซลล์จะเกี่ยวข้องกับ เซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์และรามิองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน โดยทั่วไป ผนังเซลล์แบคทีเรีย (ยกเว้นมัยโคพลาสมา) ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน(peptidoglycan) ซึ่งมีกรดอะมิโน (amino acid) และอะมิโนซูการ์ (amino sugar) ต่อโยงกัน มีกรดไคโคอิก (teichoic acid) หรือ ลิพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ลิพิด โปรตีน ลิพโพรตีน (lipoprotein) และคาร์โบไฮเดรต ผนังเซลล์ของยีสต์และราประกอบด้วยไคติน (chitin) กลูแคน(glucan)แมนแนน (mannan) ลิพิด โปรตีน และบางพวกอาจมีเซลลูโลสประกอบด้วย และเชื้อไวรัสเป็นเพียงกรดนิวคลีอิกและโปรตีน สปอร์ของแบคทีเรีย ยีสต์และราก็มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกับตัวเซลล์ โดยเฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียจะมีสารแคลเซียมไดปีโคลิเนต (calcium dipicolinate) ประกอบด้วย

ด้วย ส่วนประกอบที่อยู่บริเวณผิวเซลล์จึงน่าจะมีปฏิกิริยาหรือเกี่ยวข้องกับสารป้องกันความเย็นที่ใช้เคลือบเซลล์ นอกจากนี้ น้ำของเซลล์จุลินทรีย์ก็มีบทบาทต่อการรอดชีวิตทั้งในระหว่างกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งและภายหลังกระบวนการ (สมบุญ ธนาสุวัฒน์, 2544 หน้า 66)

ผลของน้ำภายในเซลล์ที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

น้ำของเซลล์พืชและสัตว์รวมทั้งจุลินทรีย์แสดงบทบาทสำคัญในแง่ของปฏิกิริยาภายในเซลล์และช่วยรักษาโครงสร้างของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ของพืชและสัตว์ การทำให้เซลล์เยือกแข็งพร้อมไปกับการทำให้เซลล์แห้งเป็นการจัดหาน้ำภายในเซลล์ออกไป พบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์จะทนทาน (resistant) ต่อการทำให้เยือกแข็งหรือการทำให้แห้งมากกว่าเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เราอาจวัดปริมาณน้ำของเซลล์ได้ในรูปของค่า water activity (a_w) เช่น เซลล์จุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจะมีค่า a_w น้อยกว่า 0.05 (สมบุญ ธนาสุวัฒน์, 2544 หน้า 66) ในระหว่างการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจะทำให้เกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ จากการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อไปพร้อม ๆ กับการทำให้เยือกแข็งพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่จะรอดชีวิต ในกรณีที่ทำให้เยือกแข็งอย่างช้า ๆ คือ การลดอุณหภูมิลงทีละน้อย แต่เซลล์ส่วนใหญ่จะตายในกรณีที่ทำให้เยือกแข็งโดยลดอุณหภูมิลงทันที นอกจากนี้การเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์จะทำให้ไอเล็กโตรไลต์ (electrolyte) เข้มข้นขึ้น การเติมสารป้องกันความเย็นจะช่วยให้อิเล็กโตรไลต์เป็นกลางและลดการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำที่เหลืออยู่บ้าง (residual water) ซึ่งจะทำให้เชื้อรอดชีวิตมากขึ้น (สมบุญ ธนาสุวัฒน์, 2544 หน้า 67-68)

ประเภทของสารป้องกันความเย็น

สามารถแบ่งกลุ่มสารป้องกันความเย็นหรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์ตามคุณสมบัติความเป็นกรดหรือเบส การเป็นสารรีดิวซ์และขนาดของโมเลกุลดังนี้ (สมบุญ ธนาสุวัฒน์, 2544 หน้า 68-69)

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด (acidic monomers) เช่น กลูตาเมต แอสปาราจีน (asparagines) มาเลต (malate) และแอสปาดेट (aspartate)

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง (neutral monomers) เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส (lactose) ซูโครส แรฟฟิโนส (raffinose) ซอร์บิตอล (sorbitol) ไซลิตอล (xylitol) อินอซิทอล และดีแอล – ทรีโอนีน (DL – threonine)

น้ำตาลเป็นสารป้องกันความเย็นจากการแช่เยือกแข็งที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์การทำแห้งแบบเยือกแข็ง น้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารป้องกันความเย็นเนื่องจากการแช่เยือกแข็งที่ดี ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่นกลูโคสและฟรุกโตส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครสและแลกโตส เป็นต้น (Canter and Peniston, 1940 อ้างอิงมาจาก นิรมล ลิธิระ, 2547 หน้า 15)

น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่นิยมใช้ เป็นสารป้องกันความเย็นเนื่องจากการแช่เยือกแข็งเนื่องจากหาได้ง่าย ราคาถูกและมีประสิทธิภาพสูง Lee and Timasheff (1981) พบว่าการเติมซูโครสลงในระบบที่มีโปรตีน α chymotrypsin สามารถเพิ่มความคงตัวของโปรตีนได้โดยมีค่าพลังงานต่ำสุดที่สามารถทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (activation energy) เพิ่มขึ้นเมื่อโปรตีนอยู่ในระบบที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น คือ มีค่าเท่ากับ 31, 35, 36 และ 41 kcal/mol. เมื่อโปรตีนอยู่ในระบบที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5 และ 0.7 molar ตามลำดับ แต่การใช้ซูโครสทำให้ผลิตภัณฑ์ได้มีสีคล้ำและมีความหวานมากเกินไป (จักรี ทองเรือง, 2544)

นอกจากนี้ น้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคุณสมบัติ ในการเป็นสารป้องกันความเย็นเนื่องจากการแช่เยือกแข็ง เช่น กลีเซอรอล อะโดนิทอล อะราบิทอล โซลิทอลและซอร์บิทอล เป็นต้น

กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันความเย็นที่มีประสิทธิภาพสูง โดยกลีเซอรอลจัดเป็นสารให้ความหวานในกลุ่ม trihydric alcohol ที่ผลิตได้จากกระบวนการต่างๆ คือ การสกัดกลีเซอรอลจากไขมันและน้ำมันของพืชและสัตว์ การหมักน้ำตาล ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตสบูด้วยปฏิกิริยา saponification ของน้ำมันและไขมัน และการผลิตกลีเซอรอลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไขมัน (Leffingwell and Lesser, 1945) ซึ่งลักษณะของกลีเซอรอลคือ เป็นของเหลวใสไม่มีสี มีความข้นหนืดสูง ความหวานประมาณ 0.6-0.7 เท่าของน้ำตาลซูโครสมีจุดเดือดสูงประมาณ 290°C และจุดเยือกแข็งประมาณ -17°C คุณสมบัติที่สำคัญของกลีเซอรอลคือ ความสามารถในการดูดความชื้น เป็นตัวทำละลายที่ดี เพิ่มความหนืดของอาหารและค่า a_w ของอาหาร (นิรมล ลิธิระ, 2547 หน้า 17)

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเบส (basic monomers) เช่น ไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine)

สารประกอบจำพวกพอลิเมอร์และดีเกรเดทีฟ (polymers and its degradatives) เช่น อัลบูมิน (albumin) เจลาติน มิวซิน (mucin) เปปโตน แป้ง เดกสตริน (dextrin) เพกติน (pectin) พอลิเมอร์ของซูโครส เดกสเตรน (dextran) ส่วนสกัดจากเนื้อ ส่วนสกัดจากยีสต์พอลิไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) คาร์บอซีเมทิลเซลลูโลส (carboxy methylcellulose) และฟิโคล (phocol)

สารประกอบธรรมชาติ (natural substances) เช่น สคิมมิลค์ และซีรัม

สารประกอบจำพวกรีดิวซ์ (reducing agents) เช่น แอสคอร์เบต (ascorbate) ซีสทีอิน (cysteine) ไฮดรอกซิลามีน (hydroxylamine) และเซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide)

ผลของสารป้องกันความเย็นที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

การเติมสารป้องกันความเย็นนั้นสามารถเลือกใช้ได้แตกต่างกัน โดยอาจเตรียมเป็นสารละลายชนิดเดียวสำหรับผสมกับเชื้อ เช่น สารละลายของสคิมมิลค์ กลูโคส ซูโครส อินซูลิน เดกสเตรน เจลาติน พอลิไวนิลไพโรลิโดน กลูตามेट และเปปโตน หรืออาจเตรียมเป็นส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตกับซีรัม การจะเลือกใช้สารชนิดใดและต่อเชื้อประเภทใดนั้นควรมีการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งเสียก่อน

กิจกรรมของสารป้องกันความเย็นจะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นโดยทั่วไป สารที่ช่วยป้องกันได้ดีต้องมีหมู่ไฮโดรเจนบอนด์อยู่ในโมเลกุลสามหมู่หรือมากกว่าและมีหมู่ที่ไอโอไนส์ได้อยู่ด้วย คือ มีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน มีหมู่คาร์บอนซียูที่ตำแหน่งแอลฟาและแกมมาและมีส่วนของโมเลกุลระหว่างหมู่แกมมา คาร์บอซีและหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ พบว่าการเติมสารจำพวกที่มีหมู่อะมิโน จะมีส่วนลดพิษของอนุมูลคาร์บอนิลได้ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ ซึ่งอาจช่วยในการป้องกัน เช่น ไชลิทอลมีผลป้องกัน แต่อิทริทอลไม่มีผลป้องกัน นอกจากนี้ขนาดของโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ เช่น กลูตามेट มีกิจกรรมสูงเมื่อเทียบกับสารพวกแอลฟาอะมิโนไโดคาร์บอซีเลตซอร์บิตอล สามารถช่วยป้องกันได้แต่แมนนิทอลและซัลซิทอลไม่มีผลในการป้องกัน สิ่งสำคัญซึ่งค่อนข้างซับซ้อนอีกประการหนึ่ง ก็คือ สารป้องกันความเย็น ต้องสามารถป้องกันเชื้อแห้งจากผลทางกายภาพระหว่างที่สถานะแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเช่น กลีเซอรอลและdimethylsulfoxide ความเข้มข้น 0.5 M จะซึมเข้าสู่เซลล์และช่วยลดความเสียหายเมื่อน้ำถูกขจัดออก สารประกอบขนาดใหญ่ เช่น ซีรัม อัลบูมิน เดกสเตรนและ polyvinylpyrrolidone ความเข้มข้น 10^{-5} – 10^{-3} จะไม่เข้าสู่เซลล์แต่รวมอยู่ที่ผิวของเซลล์ และป้องกันการสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงใหม่ เชื้อที่ทำแห้งต้องมีลักษณะเป็นเค้ก (cake) ไม่ควรเป็นผง (powder) การเลือกอาหารที่สมบูรณ์เพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากที่เก็บรักษาไว้นาน ก็จะมีผลทำให้เชื้อรอดชีวิตได้มากขึ้น (สมบุญ ธนาศุภวัฒน์, 2544 หน้า 69-71)

การรอดชีวิตของเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นขึ้นอยู่กับน้ำที่เป็นองค์ประกอบภายในของเซลล์ และผลของปฏิกิริยาของสารป้องกันความเย็นกับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารป้องกันความเย็นจะทำให้ไอเล็กโทรไลต์เป็นกลางไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำ

สารเข้าออกของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญเสียไป และสารป้องกันความเย็นยังป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำไปเพาะเชื้อใหม่ การจะเลือกใช้สารป้องกันความเย็นชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับผลการทดลองโดยสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของเครื่องทำความเย็นและเครื่องดูดแห้ง การเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งไว้ ณ อุณหภูมิที่ไม่เป็นอันตรายและการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลายาวนาน โดยเลือกใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงใหม่อย่างเหมาะสมก็จะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดเป็นจำนวนมาก(สมบุญ ธานสุวัฒน์, 2544 หน้า 72)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Brain และคณะ (1997) ได้ทำการวิจัยโดยนำแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* D11, *Lactobacillus casei* ssp. *Pseudopantarum* UL137 และ *Streptococcus thermophilus* CH3TH ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและแบบฉีดพ่นฝอย (spray dry) แล้วทำการหาค่าอัตราการรอดชีวิตรวมทั้งความสามารถในการผลิตกรดแลคติกทั้งก่อนและหลังการทดลอง พบว่า เชลล์แบคทีเรียเกือบทั้งหมดยังคงรอดชีวิตเมื่อผ่านขั้นตอนการแช่แข็ง แต่เมื่อผ่านขั้นตอนทำแห้งแล้วมีเชลล์เหลือรอดชีวิตประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ในการทำแห้งทั้งสองวิธีนี้ทำให้แบคทีเรียมีอัตราการผลิตกรดแลคติกช้าลง อีกทั้งยังพบว่าวิธีการฉีดพ่นฝอยนั้นทำให้ *S. thermophilus* เหลือเชลล์ที่มีชีวิตรอดมากที่สุด ในขณะที่ *Lc. Cremoris* เหลือเชลล์ที่มีชีวิตน้อยที่สุด

Beker and Rapoport (1987) ใช้กระบวนการการทำแห้งแบบแช่แข็งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ยีสต์ พบว่า เมื่อน้ำแข็งออกจากเซลล์ เกิดรอยแตกของไซโตพลาสซึมเมมเบรนทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออก จากเซลล์ โครมาตินเกิดการรวมตัวกันและเกิดการแยกของโครโมโซมตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในยีสต์แห้งที่ได้จากกระบวนการนี้มีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ

Ravula และ Shah (1998) ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โยเกิร์ต (*Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* และ *S.salivarius* subsp. *Thermophilus*) และจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Lb. acidophilus* และ *Bifidobacterium* sp.) ใน fermented frozen dairy desserts โดยใช้สายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะที่ถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส ในน้ำตาล 8 ถึง 16 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่เป็นกรด มาเป็นกล้าเชื้อในการหมัก เมื่อทำการทดลองหมัก fermented frozen dairy desserts พบว่า หลังแช่แข็งเป็นเวลา 12 สัปดาห์ปริมาณจุลินทรีย์โยเกิร์ตมีค่าลดลง 1 log cycle ส่วนปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะมีค่าลดลง 5 ถึง 6 log cycle

Reilly และ Gilliland (1999) คัดเลือกสายพันธุ์ที่รอดชีวิตระหว่างการแช่เยือกแข็งและเก็บในตู้เย็น ซึ่งสัมพันธ์กับค่าพีเอชระหว่างการเจริญ ทำการเก็บรักษาจุลินทรีย์ใน MRS – Thipbroth (laboratories, Detroit, MI) เติม sodium thioglycolate 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Sigma Chemical co., St.Louis, Mo) พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นและค่าพีเอชมีผลต่อการเก็บรักษาจุลินทรีย์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารป้องกันเซลล์ในการทำแห้ง

Capela and others (2005) ได้ทำการศึกษาผลการใช้สารป้องกันอันตรายจากความเย็น โพรไบโอติกและการทำให้เกิดสารห่อหุ้มเซลล์ในโยเกิร์ตพบว่า การใช้สารป้องกันอันตรายชนิด Unipeptin ที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มการอยู่รอดของ *Bifidobacteria logum* ได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และการใช้โพรไบโอติกชนิด fructooligosaccharide ปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยเพิ่มการเหลือรอดของโพรไบโอติกได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนประมาณ $8.7 \log \text{cfu/g}$ และในการทำให้เกิดสารห่อหุ้มเซลล์ของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตแช่แข็งแห้งพบว่าหลังจาก 6 เดือนของการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 21°C เซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกมีการเหลือรอดเพิ่มมากขึ้น

Freireira et al. (2005) ได้ศึกษาผลของการเติมน้ำตาลซูโครส หรือ monosodium glutamate (MSG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อเชื้อที่รอดชีวิตภายหลังจากการเก็บรักษาในรูปเชื้อผงโดยการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าเชื้อ *Lactobacillus sakei* CTC 494 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสมน้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร และ MRS ที่ผสม MSG 12.5 กรัม/ลิตร เมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 20°C ในสภาวะที่มีอากาศจะมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร MRS อย่างเดียว ทั้งนี้เพราะในระหว่างการทำแห้งเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำให้มีค่า a_w ที่ต่ำลง ดังนั้นเซลล์จึงมีการสะสม compatible solutes ที่จะช่วยเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ซึ่งในระหว่างกระบวนการทำแห้งซึ่งใช้เวลานาน เซลล์ไม่อาจสามารถสะสม compatible solutes ได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่เซลล์จะมีการสะสม compatible solutes ก่อนกระบวนการทำแห้ง เช่นในระหว่างการเจริญเติบโต (during growth phase) สอดคล้องกับการอธิบายของ Morgan et al. (2006) ว่า จุลินทรีย์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูง (osmotic stress) หรือ low water activity จุลินทรีย์จะสะสม compatible solutes เช่น โพลีออล กรดอะมิโน หรืออนุพันธ์ของกรดอะมิโน หรืออื่น ๆ เพื่อรักษาสภาพออสโมติกภายในเซลล์ในสมดุลกับแรงดันออสโมติกที่เพิ่มสูงขึ้นภายนอกเซลล์และสาร compatible solutes เหล่านี้เองที่ช่วยรักษาสภาพของโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายเมื่อมีการทำแห้ง

นอกจากนี้ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของเชื้อในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ได้แก่ carrier ซึ่งมีอิทธิพลต่อความเสถียรของเชื้อในระหว่างการเก็บรักษา Corcoran et al. (2004) พบว่า

เมื่อทำแห้งแบบพ่นฝอยเชื้อ *lactobacilli* พบว่า skim milk เป็น spray drying carrier ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าการมี disaccharides สามารถช่วยให้เชื้อหุ้มเซลล์มีเสถียรภาพในระหว่างการแช่แข็งและการเก็บรักษา ตัวอย่างเช่น sorbitol ช่วยป้องกันความเสียหายของเชื้อหุ้มเซลล์โดยการเกิดอันตรกิริยากับเชื้อหุ้มเซลล์และจะช่วยรักษาเสถียรภาพของโปรตีนและโครงสร้างเซลล์ (Meng et al., 2008) โดยน้ำตาลจะแทนที่โมเลกุลของน้ำในระหว่างการทำแห้ง โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนรอบ ๆ polar และ charge group ของ phospholipids membrane และโปรตีน ทำให้โครงสร้างมีเสถียรภาพ (Tymczynsyn et al. 2007) การควบคุม phase transition temperature ของ dry membrane เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการควบคุม free radical activity

Rekasi et al. (1992) พบว่าการใช้ซูโครสและซอร์บิทอล (1:1) 5% เป็นสารป้องกันความเย็นสามารถยับยั้งการเสียหายของโปรตีนในเนื้อหุ้มบดแช่เยือกแข็งได้ดีกว่าการใช้กลูโคสร่วมกับซอร์บิทอลและกรดซิตริก (89:10:1) 5% หรือการใช้กลีเซอรอล 5% แต่การใช้ซูโครสและซอร์บิทอลมีข้อเสียคือ ให้ความหวานและพลังงานสูง Tomaniak et al. (1998) พบว่าปริมาณต่ำสุดที่ผู้ทดสอบสามารถรับรสหวาน (recognition thresholds) ของซูโครสและซอร์บิทอลในเนื้อวัวและเนื้อหมูคือ 1 กรัม/100 มิลลิลิตร และ 1.6 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับมอลโตเด็คซ์ตรินและโพลีเด็คโตสซึ่งสามารถรับรสหวานได้เมื่อใช้ 5.0-5.5 กรัม/100 มิลลิลิตรและ 7 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

Melendo et al. (2001) ซึ่งพบว่า การใช้กลีเซอรอลหรือซอร์บิทอล 4% สามารถรักษาการทำงานของเอนไซม์ cathepsin และ proteolytic ใน bovine spleen lysosomal-enriched extract ที่แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20°C ได้

Park et al. (1996) พบว่าการใช้ซอร์บิทอล 3% หรือ 6% กลีเซอรอล 3% หรือซูโครส 3% ไม่มีผลต่อความสามารถในการเกิดเจลของผลิตภัณฑ์คล้ายซูรีมจากเนื้อหมูและเนื้อวัว โดยค่าความแข็งของเจลก่อนแช่เยือกแข็งและหลังจากแช่เยือกแข็งที่ -20°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าการแช่เยือกแข็งระยะเวลาสั้นไม่จำเป็นต้องใส่สารป้องกันโปรตีนเสียหายเนื่องจากการแช่เยือกแข็ง

Yang et al. (1990) ศึกษาผลของสารป้องกันโปรตีนเสียหายเนื่องจากการแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไก่แช่เยือกแข็งพบว่า การใช้ ซูโครสร่วมกับซอร์บิทอลและโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตสามารถลดปริมาณกรดไขมันอิสระและเพิ่มปริมาณการสกัดโปรตีนที่ละลายในน้ำเกลือ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณการสกัดโปรตีนที่ละลายในน้ำ