



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมกรรมการอาหาร)

ปริญญญา

วิศวกรรมกรรมการอาหาร

วิศวกรรมกรรมการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ที่เป็น Probiotics ภายใต้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

The Study of Stability of Probiotics under Partial Freeze-drying

นามผู้วิจัย นางสาวฉิระพร เกลี้ยงจำ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มนต์ทิพย์ ชำของ, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เชาว์ อินทร์ประสิทธิ์, D.Eng.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สมยศ เชื้ออักษร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ประภาศรี สิงห์รัตน์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงวี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ที่เป็น Probiotics ภายใต้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

The Study of Stability of Probiotics under Partial Freeze-drying

โดย

นางสาวธีระพร เกลี้ยงข้า

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมอาหาร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โพรไบโอติก (Probiotics) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพราะช่วยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและช่วยให้สัตว์มีระบบการดูดซึมและการย่อยอาหารที่ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของสัตว์ด้วย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ประสงค์เพื่อศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกภายใต้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและพัฒนาเทคนิค หรือกระบวนการรักษาสภาพของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ โพรไบโอติกต้นแบบของ *Lactobacillus acidophilus* TISTR โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนโดยวางแผนการทดลองแบบ 3 x 3 x 3 x 2 Factorial experimental in Completely Randomized Design และในแต่ละการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้ง 4 ได้แก่ ชนิดของสารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant : แกลโคส กลูโคส และ ซูโครส) ปริมาณความชื้นระดับ 3 ระดับ (5, 10, และ 15 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส) และหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium Carbonate) ในอัตราส่วน 1:1 (v/w) ของสารอาหารที่ใช้เลี้ยง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ผล โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ซึ่งจะทำให้สามารถป้องกันความเย็นและปัจจัยของกระบวนการผลิตที่เหมาะสมเฉพาะกับจุลินทรีย์ตามสายพันธุ์

ลายมือชื่อนิติ ลายมือชื่อประธานกรรมการ / /

Thiraporn Kliangkham 2010 : The Study of Stability of Probiotics under Partial Freeze-Drying.
Master of Engineering (Food Engineering), Major Field: Food Engineering, Department of Food
Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Montip ChamChong, Ph.D. 108 pages.

Probiotics is the food supplement products which are mostly used in animal feed industries since it is able to prohibit the growth of pathogen and enhance the food absorption and digestive system in the intestine. It also affects on the balance of microorganisms in the intestine of the animal as well. Thus the objectives of the research are to study the stability of probiotics microorganism under partial freeze-drying and to develop preservation technique from this drying process. Therefore the experimental design of 3x3x3x2 factorial in completely randomized with 3 replications was used to study the factors effect on prototype probiotics microorganism of *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034. Three types of cryoprotectants: - lactose, glucose and sucrose and each has 3 levels of concentration: - 5, 10, and 15% and 3 levels of drying temperature: - 60, 75, and 90°C as well as with/without addition of CaCO₃ for assisting drying were the studied factors. The result was analyzed for the difference by the analysis of variance and Duncan's new multiple range tests in order to obtain the appropriate drying condition specific for the strain of microorganism.

It was found that the percentage of the survival amount of microorganism from 3 levels of drying temperature was significantly different ($p < 0.05$). At the drying temperature of 60 °C, the percentage of the survival mount of microorganism was highest at 36.91% (4.95×10^7 CFU/ml) while at 90 °C, it was minimal at 12.56% (1.67×10^7 CFU/ml). However at the same drying temperature and same concentration of cryoprotectant without the addition of CaCO₃, the survival amount of microorganism from samples treated with different types of cryogenic protectants was significantly different ($p < 0.05$). Lactose at 15% provides highest survival amount the microorganism while sample with 5% sucrose obtained the minimum. Moreover survival amount of microorganism could be significantly increased with an assisting of adding 1:1 v/w CaCO₃ into MRS broth during drying. Therefore drying temperature of 60 °C and using 15% lactose as cryoprotectant together with 1:1 v/w CaCO₃ provided such a co-factor affecting-condition that the percentage of the survival mount of microorganism was highest at 99.63-99.69% (1.42×10^8 - 1.44×10^8 CFU/ml) and significantly different ($p < 0.05$) from others.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนต์ทิพย์ ชำของ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนการให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ อีกทั้งที่จะขาดเสียมิได้เลยก็คือท่านคณะกรรมการ อันประกอบไปด้วย อาจารย์ ดร.เชาว์ อินทร์ประสิทธิ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สมยศ เชิญอักษร รวมถึงผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รติยา พงศ์พิศุทธา ได้กรุณาช่วยเหลือชี้แนะในสิ่งที่เป็นประโยชน์ และทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ตามที่ตั้งเจตจำนงไว้

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ให้กำลังใจ ชี้แนะ และสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ธีระพร เกลี้ยงจำ

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	33
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	83
สรุป	83
ข้อเสนอแนะ	85
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	86
ภาคผนวก	89
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ NCTC	22
2	ข้อมูลทางเคมีของกลูโคส	27
3	ข้อมูลทางเคมีของซูโครส	28
4	ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนการเติม Calcium carbonate ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	43
5	ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างเมื่อทำการเติม Calcium carbonate	44
6	ผลทางสถิติ (ANOVA) ของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติม สารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตสำหรับการรอดชีวิตของ เชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	54
7	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง	55
8	ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของอุณหภูมิในช่วงทำแห้งสำหรับการรอดชีวิตของ เชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	55
9	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ของอุณหภูมิในช่วงทำแห้งสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลัง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	56
10	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรชนิดของสารป้องกันความเย็น	56
11	ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของสารป้องกันความเย็นแต่ละชนิดสำหรับ การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	57
12	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ของสารป้องกันความเย็นสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลัง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	58
13	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรปริมาณของสารป้องกันความเย็น	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14	ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของปริมาณการเติมสารป้องกันความเย็นสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน
15	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ของสารป้องกันความเย็นสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน
16	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต
17	ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน
18	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็น
19	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็น
20	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต
21	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น
22	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต
23	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต
24	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น
25	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต
26	ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
27 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของ สารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	78
28 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	79
 ตารางผนวกที่	
1 ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งที่ 1	90
2 ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งที่ 2	93
3 ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งที่ 3	96
4 ค่าการเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ในการทดลองครั้งที่ 1	99
5 ค่าการเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ในการทดลองครั้งที่ 2	102
6 ค่าการเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ในการทดลองครั้งที่ 3	105

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 Freeze Dryer ชนิด Manifold	8
2 Freeze Dryer ชนิด Tray Dryer	9
3 Freeze Dryer ชนิด Bulk Method	10
4 การทำงานของเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	10
5 แสดงขอบเขตระหว่าง ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ของน้ำในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	12
6 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	15
7 การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Haemophilus suis</i> ที่เติมสารป้องกันความเย็นซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือนภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	20
8 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	31
9 ตู้เย็นแช่แข็ง Whirlpool, รุ่น WRN-16L	31
10 เครื่องวัด ATP	32
11 หลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิดขนาด 14 ml สำหรับใส่วัตถุติด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm	32
12 แผนการทดลองของตัวแปรอิสระทั้ง 4 ตัวแปร	34
13 การวางหลอดทดลองพลาสติกใส่วัตถุติดในเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน	35
14 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นกับระยะเวลาในการทำแห้งจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส ความดันประมาณ 50-200 mbar	44
15 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 5 %	45
16 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียสเติมสารป้องกันความเย็น 10 %	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 15 %	46
18 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 5 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต	46
19 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 10 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต	47
20 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 15 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต	47
21 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส และมีการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับการใช้สารป้องกันความเย็นที่ 15% ของแลคโตส	49
22 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 5 %	50
23 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 10 %	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
24 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 15 %	51
25 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 5 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต	51
26 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 10 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต	52
27 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมสารป้องกันความเย็น 10 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต	52
28 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็น	62
29 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็น	64
30 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	66
31 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น	68
32 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	70
33 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต	72

การศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ที่เป็น Probiotics ภายใต้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

บางส่วน

The Study of Stability of Probiotics under Partial Freeze-drying

คำนำ

ผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรทำรายได้เข้าประเทศมากกว่า 694,177 ล้านบาทต่อปี โดยเป็นอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการปศุสัตว์ถึง 76,096 ล้านบาทต่อปี ดังนั้นการปศุสัตว์ของไทยจึงมีการขยายตัวและเพิ่มกำลังการผลิตเรื่อยมาโดยผู้ประกอบการได้พยายามปรับตัวและพัฒนาหาแนวทางเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตควบคู่ไปด้วย ปัจจุบันปัจจัยการผลิตทั้งทางด้านอาหารสัตว์และเคมีภัณฑ์จึงจำเป็นต้องใช้เพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยส่วนใหญ่สามารถผลิตได้ในประเทศ แต่ก็ยังประสบปัญหาจากอาหารสัตว์ที่ผลิตได้มีคุณภาพทางโภชนาการต่ำ ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาได้คือการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในอาหารสัตว์ให้เป็นอาหารได้ เช่น *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ Amylase ที่ช่วยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล Maltose ยังมีเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างกรด Diaminopimelic (DAP) แล้วถูกเอนไซม์ DAP decarboxylase ที่ผลิตขึ้นได้จากเชื้อ *Acetobacter aerogenes* เปลี่ยนให้ได้กรดอะมิโน L-lysine ได้ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้ ซึ่งเรียกจุลินทรีย์พวกนี้ว่า โพรไบโอติก (probiotics) (พรรณทิพย์, 2547)

โพรไบโอติกจึงเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมของสัตว์ที่สามารถช่วยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและช่วยให้สัตว์มีระบบการดูดซึมและการย่อยอาหารได้ดีขึ้นช่วยให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของสัตว์ สัตว์เจริญเติบโตได้อย่างแข็งแรง มีอัตราการเพิ่มของ

เนื้อมากขึ้น ทำให้ลดต้นทุนในการซื้ออาหารสัตว์ อาหารเสริม ฮอร์โมนต่าง ๆ รวมทั้งสารปฏิชีวนะจึงช่วยลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ ไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์และสิ่งแวดล้อม ผู้บริโภคสามารถบริโภคเนื้อสัตว์ได้อย่างปลอดภัย

ปัจจุบันความต้องการการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ทั้งยีสต์, รา เพื่อการแปรรูปสัตว์มีมากขึ้นจนทำให้เกิดความพยายามพัฒนาการผลิตจุลินทรีย์ให้ได้เป็นปริมาณมากหรือในระดับอุตสาหกรรม เช่น การพัฒนาการผลิตจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกในระดับโรงงานต้นแบบ หรือการขยายขนาดการผลิตในถังหมักขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนการเก็บรักษาเพื่อการรักษาสภาพของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้นในลักษณะผลิตภัณฑ์ผง ในประเทศไทยยังขาดช่วงของเทคโนโลยีที่เหมาะสมมารองรับเพื่อที่จะทำให้การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์สามารถทำได้ง่ายขึ้นและกว้างขวางขึ้น

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-drying) ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและยาในต่างประเทศ เพื่อการเก็บรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์พวก bacterial culture ที่ถูกทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เช่นนำไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ตหรือยีสต์ก็มักจะมีค่า activity ลดลงไปมากหลังจากถูกทำแห้งและเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องภายใน 2-3 สัปดาห์ (anonymous, 2005) ทำให้การใช้ประโยชน์โดยเฉพาะในประเทศไทยยังมาจากการหมักหรือผลิตโดยตรง และไม่มีการแปรรูปเพื่อส่งออก

ดังนั้นจึงควรมีการทำวิจัยศึกษาอย่างเป็นระบบถึงการนำ bacteria culture เหล่านี้ มาผ่านกระบวนการทำแห้งแช่เยือกแข็งที่มีการเติมสารเพื่อปกป้องจุลินทรีย์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสมระหว่างทำแห้งคือ สาร cryoprotectants และสาร calcium carbonate เพื่อเป็นการเก็บรักษาและแปรรูปให้อยู่ในรูปแบบที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและสะดวกขึ้น อย่างไรก็ตามการทำแห้งแช่เยือกแข็งแบบบางส่วน (Partial freeze-drying) จะช่วยให้การทำแห้งทำได้รวดเร็วขึ้นเพราะเป็นการใช้กระบวนการทำแห้งแช่เยือกแข็งควบคู่กับการทำแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum drying) ผลกระทบจากกระบวนการทำแห้งแช่เยือกแข็งแบบบางส่วนนี้ต่อสภาพหรือความคงตัวของจุลินทรีย์

probiotics ต้นแบบ (*Lactobacillus acidophilus*) จึงถูกนำมาเป็นประเด็นศึกษาก่อน ซึ่ง จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีผลต่ออุตสาหกรรมอาหาร หรืออาหารสัตว์ก็สามารถนำผลงานไปใช้พัฒนาต่อยอดได้ ที่นำไปสู่การผลิตเป็นสินค้าเชิงพาณิชย์ (commercialization) และนำไปเผยแพร่ให้กับเกษตรกรได้ง่าย หรือส่งขายเป็นสินค้าออกต่อไปเนื่องจากมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น และอยู่ในรูปแบบของ ผลิตภัณฑ์ที่ง่ายต่อการขนส่งและบรรจุ



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความคงตัวของจุลินทรีย์ภายใต้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน
2. เพื่อพัฒนาวิธีหรือกระบวนการรักษาสภาพของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน



การตรวจเอกสาร

Probiotics

สารเสริมชีวนะ เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นอาหารได้โดยตรง (Food) หรืออาจใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร (Food additives) สำหรับมนุษย์และสัตว์ได้ โพรไบโอติกจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมของอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ที่สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและช่วยให้สัตว์มีระบบการดูดซึมและการย่อยอาหารได้ดีขึ้นช่วยเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของสัตว์ สัตว์เจริญเติบโตได้อย่างแข็งแรง มีอัตราการเพิ่มของเนื้อมากขึ้น ทำให้ลดต้นทุนในการซื้ออาหารสัตว์ อาหารเสริม ฮอโมนต่าง ๆ รวมทั้งสารปฏิชีวนะจึงช่วยลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ ไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์และสิ่งแวดล้อม ผู้บริโภคสามารถบริโภคเนื้อสัตว์ได้อย่างปลอดภัย

ประโยชน์ของ *Lactobacillus acidophilus*

ปีนมณี (2547) ได้รายงานถึงประโยชน์ของ *Lactobacillus acidophilus* ไว้ดังนี้

1. การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีความปลอดภัยสูงขึ้นตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง คือ การสร้างกรดและการลดลงของค่าพีเอช กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมคือ กรดแลคติก นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นและมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น Acidophilin lactocidin และ Acidolin lactolin ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทโพลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน

2. ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด

Lactobacillus acidophilus จะช่วยให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล นอกจากนั้นยังมีผลในการลดน้ำหนักได้ประมาณ 2.3-2.7 กิโลกรัม ภายใน 3 สัปดาห์ และยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโตส

3. กิจกรรมในการป้องกันมะเร็ง

Lactobacillus acidophilus เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาถึงการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่าทำให้ระดับของเอนไซม์ β -glucuronidase, azoreductase และเอนไซม์ nitroreductase เพิ่มขึ้น เอนไซม์เหล่านี้ยังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเปลี่ยนแปลงของ procarcinogen ไปเป็น carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้ ผลของ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ ทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้บริโภคลดลง

4. ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

มีการศึกษาที่พบว่า *Lactobacillus acidophilus* เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีความไวต่อ microphage และ lymphocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การเก็บรักษาสารหรือวัตถุดิบต่าง ๆ มีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีจุดเด่นแตกต่างกัน โดยมีจุดประสงค์เดียวกันคือ เก็บรักษาสารให้นานและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคุณสมบัติเริ่มต้นมากที่สุด วิธีหนึ่งที่นิยมในการเก็บรักษาสารก็คือ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง วิธีนี้สามารถเก็บรักษาสารได้เป็นเวลานานเช่นเดียวกับวิธีแช่แข็งแต่ไม่เปลี่ยนเนื้อที่ในการเก็บ เพราะสารจะถูกระเหิดน้ำออกจนแห้งในสภาพสุญญากาศ และไม่จำเป็นต้องเก็บในที่เย็น ผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้ส่วนใหญ่จึงมักอยู่ในรูปผงหรืออยู่ในสภาพแห้งมาก ๆ โดยมีเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการ

โดยปกติที่สภาพสุญญากาศที่ประมาณ 5-50 มิลลิทอร์ (0.005-0.05 มิลลิเมตรปรอท) จะเป็นสภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดแต่ในเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยทั่วไป จะสามารถลดความดันได้ที่ประมาณ 100-120 มิลลิทอร์ (0.1-0.12 มิลลิเมตรปรอท) หรือต่ำกว่านี้เล็กน้อย ซึ่งนับว่าเพียงพอสำหรับการทำแห้งแล้ว (เอกคนัย, 2548)

รูปแบบของการทำแห้งเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นมีรูปแบบของการทำแห้งอยู่ 3 แบบ ซึ่งแบ่งตามลักษณะการทำแห้งของเครื่อง โดยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งชนิด manifold จะมีรูปแบบการทำแห้งแบบ manifold แบบเดียว ในขณะที่เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งชนิด tray dryer จะมีรูปแบบการทำแห้ง 2 แบบ คือแบบ batch และ bulk

Manifold Method

วิธีนี้ภาชนะบรรจุตัวอย่าง (พลาสติก, หลอด ampule หรือ หลอด vial) จะแยกติดกับช่องของ manifold หรือ drying chamber แบบเดี่ยว ๆ ผลิตภัณฑ์จะถูกทำให้เย็นจนแข็งจากตู้แช่แข็ง (freezer) หรืออ่างน้ำแข็ง (ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพธรรมชาติและปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง) ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้วจะต้องนำมาเข้าสู่ drying chamber อย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ที่อาจจะเกิดขึ้นจากการละลาย สภาพสุญญากาศจะถูกสร้างขึ้นมาในภาชนะบรรจุตัวอย่างอย่างรวดเร็ว และทำงานภายใต้ไอรยะเหวที่เย็นจัดเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์

วิธีการนี้สามารถใช้ประโยชน์ได้มากกว่าการทำแห้งเยือกแข็งแบบ batch tray เพราะว่าภาชนะบรรจุตัวอย่างต่ออยู่กับ manifold อย่างเดี่ยว ๆ พลาสติกหรือหลอด vial แต่ละชิ้นจึงต่อตรงกับส่วนเก็บ (collector) และสามารถใส่ภาชนะหรือผลิตภัณฑ์ต่างชนิดกัน มาทำกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งพร้อมกันได้ นอกจากนี้เมื่อตัวอย่างใดที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งเสร็จแล้ว ยังสามารถเก็บตัวอย่างได้ทันทีโดยไม่จำเป็นต้องรอให้ตัวอย่างทุกตัวอย่างเสร็จทั้งหมดด้วย วิธีนี้เหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำน้อย และมีจุด eutectic สูง

สิ่งที่ต้องระวังในการทำแห้งแบบเยือกแข็งวิธีนี้คือ อุณหภูมิห้องและการสัมผัสกับภาชนะบรรจุอาจมีผลต่อการทำแห้งตัวอย่างได้ ดังนั้นห้องที่วางเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงควรเป็นห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ และระมัดระวังการสัมผัสกับภาชนะบรรจุตัวอย่าง เพื่อช่วยให้กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยวิธี manifold สำเร็จ โดยไม่มีผลิตภัณฑ์เสียหาย



ภาพที่ 1 Freeze Dryer ชนิด Manifold
ที่มา: เอกฉนัย (2548)

Batch Method

ในการทำแห้งแบบเยือกแข็งวิธีนี้ ภาชนะที่มีขนาดเดียวกันจำนวนมากที่บรรจุตัวอย่างจะวางอยู่ด้วยกันในถาดทำแห้ง (tray dryer) ผลึกน้ำแข็งจะถูกทำให้แข็งบนชั้นที่วางถาดทำแห้งภายใน sample chamber การทำแห้งเยือกแข็งด้วยวิธีนี้ ทุกตัวอย่างจะถูกทำกระบวนการทำแห้งพร้อมกัน ด้วยสภาวะเดียวกัน จึงมีการเริ่มต้นจนถึงเสร็จสิ้นกระบวนการพร้อมกัน ทำให้มั่นใจได้ถึงสภาพแวดล้อมและความเป็นหนึ่งเดียวกันของตัวอย่าง วิธีนี้เหมาะกับการทำแห้งตัวอย่างจำนวนมากและมักใช้ในอุตสาหกรรมประเภทเวชภัณฑ์

การทำแห้งเยือกแข็งด้วยวิธีนี้ อาจเกิดความแปรผันในระบบเล็กน้อย เนื่องจากตำแหน่งของตัวอย่างที่วางอยู่ใน tray dryer โดยเฉพาะตัวอย่างที่วางอยู่ใกล้ประตูของ sample chamber ซึ่งเป็นกระจกใส ดังนั้นความร้อนและอุณหภูมิจากภายนอกอาจจะมีผลต่อตัวอย่างที่วางอยู่ใกล้ประตูได้ และจะส่งผลถึงความชื้นภายในตู้ด้วย



ภาพที่ 2 Freeze Dryer ชนิด Tray Dryer
ที่มา: เอกฉนัย (2548)

Bulk Method

วิธีนี้ตัวอย่างจะถูกเทลงใน bulk pan และทำแห้งจนเป็นหน่วยหรือเป็นเนื้อเดียวกัน โดยตัวอย่างจะถูกเกลี่ยให้พื้นผิวเป็นผิวเดียวกันและมีความหนาเท่ากัน การทำแห้งวิธีนี้จะไม่ทำการปิดผนึกผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะควบคุมเหมือนวิธี manifold หรือ batch เพราะผลิตภัณฑ์จะถูกเอาออกจากระบบการทำแห้งก่อน แล้วจึงปิดผนึกบรรจุหีบห่อในห้องบรรจุที่ปิดล้อมอย่างแน่นหนาการทำแห้งวิธีนี้มักใช้เพื่อเก็บผลิตภัณฑ์ที่เสถียรซึ่งไม่ไวต่อออกซิเจนหรือความชื้น

เทคโนโลยีของ Freeze Dryer ในปัจจุบัน

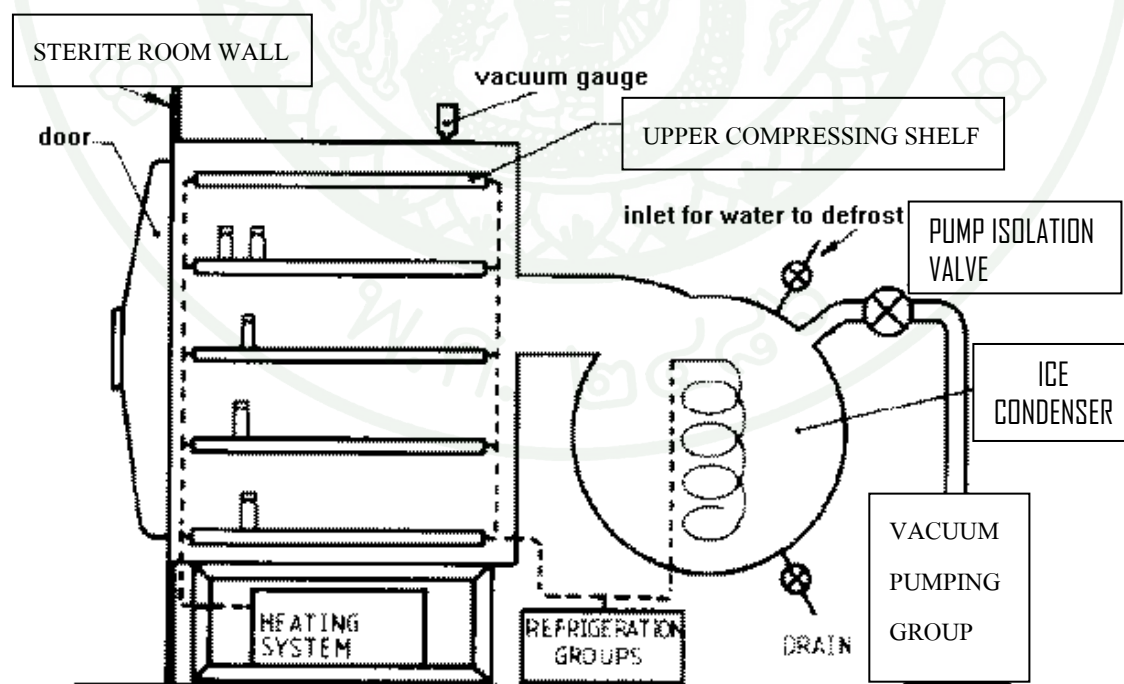
Low temperature condenser

ดังที่ได้กล่าวถึงไปแล้วว่า Condenser เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ดักจับไอน้ำที่อยู่เหนือผิวผลิตภัณฑ์ เพราะว่าเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง ความดันไอก็จะลดต่ำตาม ทำให้ความแตกต่างระหว่างความดันไอของ sample chamber และ condenser chamber เพิ่มขึ้นซึ่งจะเป็นผลให้อัตราการระเหิด (rate of sublimation) เกิดเพิ่มขึ้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งที่มี condenser ที่มีอุณหภูมิต่ำก็จะเป็นเครื่องที่มีประสิทธิภาพสูง



ภาพที่ 3 Freeze Dryer ชนิด Bulk Method

ที่มา: Wikipedia (2006)



ภาพที่ 4 แสดงการทำงานของเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ที่มา: Snowman (1988)

Automatic temperature control

ระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ เป็นระบบที่จะช่วยเพิ่มระดับความสามารถ และความสะดวก ในการใช้งานเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยมีไมโครโปรเซสเซอร์เป็นพื้นฐานของระบบควบคุม โดยสามารถกำหนดได้ทั้งระดับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำงานได้

CFC-free refrigeration system

CFC (Chlorofluorocarbons) เป็นสารที่ใช้ในการทำความเย็นซึ่งใช้ในเครื่องไฟฟ้าประเภททำความเย็น เช่น ตู้เย็น และเครื่องปรับอากาศ แต่ปัจจุบัน CFC ถือเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นสารที่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจกแก่โลกจึงเริ่มมีการเลิกใช้สารนี้ในเครื่องทำความเย็น สำหรับเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งก็เช่นเดียวกันที่ปัจจุบันมีการใช้สาร HCFCs ประกอบด้วย carbon, hydrogen, chlorine และ fluorine ซึ่งเป็นสารที่เป็นทางเลือกเพื่อนำมาใช้ทำความเย็นแทนสาร chlorofluorocarbons (CFCs) ทั้งนี้เพื่อให้การใช้งานเครื่องมือสามารถทำได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม แต่ก็ยังจัดเป็นสารทดแทนอย่างชั่วคราวเท่านั้น ซึ่งตามสนธิสัญญามอนทรีออล (The Montreal Protocol) สาร HCFCs ในอนาคตสำหรับประเทศที่พัฒนาแล้วจะต้องเลิกใช้ในปี 2030 (2573)

ประโยชน์ของการทำแห้งเยือกแข็ง

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของการทำแห้งเยือกแข็งเป็นวิธีที่ทำให้สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ได้เป็นเวลานานหลายปีโดยไม่เกิดการเสียหาย และสามารถนำกลับมาละลายน้ำใช้ใหม่ได้ง่ายโดยที่คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ยังอยู่ครบถ้วน ใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาน้อย ง่ายต่อการขนส่ง ใช้สำหรับเตรียมผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพได้ดี รวมทั้งสามารถใช้เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในรูปผงเพื่อเก็บรักษาเป็นห้องสมุดพันธุกรรม (Genetic library) ได้ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งในการเก็บรักษาได้แก่

1. เก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร และยา เช่น การเตรียมผลิตภัณฑ์ยาฉีดชนิดผงสำหรับละลายน้ำ การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรให้อยู่ในรูปผงแห้ง การเก็บรักษาผัก ผลไม้ และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารในรูปของแห้ง เช่น กาแฟ เป็นต้น

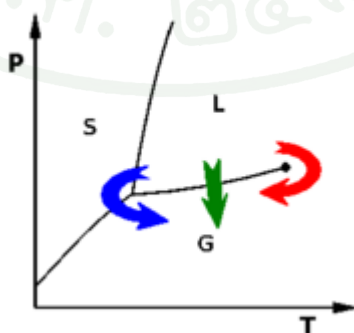
2. เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน ยาปฏิชีวนะ วิตามิน เลือด วัคซีน และแอนติไบโอติก เป็นต้น

3. เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การเก็บเชื้อแบคทีเรีย รา และยีสต์ ในรูปของผงเชื้อ โดยที่เชื้อยังไม่ตาย สามารถนำกลับมาเพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตต่อไปได้ ในบางครั้งอาจเรียกการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งว่า lyophilization

การเก็บรักษาสารโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นวิธีการเก็บรักษาสารที่มีข้อดีหลายอย่าง และเก็บรักษาสารได้หลายชนิด แต่การใช้งานเครื่องมือต้องมีความเชี่ยวชาญ ดังนั้นผู้ใช้งานจึงต้องมีความเชี่ยวชาญ และใช้งานอย่างระมัดระวังทั้งนี้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพ และสามารถเก็บรักษาได้ยาวนาน

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพ เนื่องจากการทำแห้งด้วยวิธีนี้จะสามารถรักษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส คุณค่าทางโภชนาการ และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์สุดท้ายไว้ได้ (Fellows, 1990) แต่เนื่องจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนี้มีวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน จึงต้องใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือที่มีราคาสูง จึงทำให้การพัฒนาการนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์ในประเทศค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนจึงจะนำมาศึกษาและใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงในเชิงการค้า เช่น ผลิตภัณฑ์ยา bacterial culture

กระบวนการทำแห้งจุลินทรีย์แบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-drying) คือกระบวนการระเหยนํ้าเพื่อช่วยถนอม bacteria culture ทำโดยการนำ starter ไปแช่แข็งให้มีอุณหภูมิประมาณ -50 องศาเซลเซียส จากนั้นให้ความร้อนและลดความดันลงจนเกิดสภาวะสูญญากาศทำให้นํ้าแข็งใน starter ที่เกิดจากการแช่แข็งแบบรวดเร็วเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นก๊าซแล้วทำให้ starter แห้ง ซึ่งเป็นการลดปริมาณน้ำที่เป็นส่วนประกอบใน starter ซึ่งมีผลในการยับยั้งเอนไซม์และปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ทำให้เก็บรักษาได้นาน



ภาพที่ 5 แสดงขอบเขตระหว่าง ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ของน้ำในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ที่มา: Wikipedia (2006)

จากกราฟแสดงขอบเขตระหว่าง ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ โดยมีอุณหภูมิและความดันเป็นตัวกำหนดสถานะ ซึ่งในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและลดความดันลง น้ำแข็งซึ่งมีสถานะเป็นของแข็งจะเปลี่ยนเป็นก๊าซทันที โดยที่กระบวนการระเหิดเกิดขึ้นเมื่อความดันไอและอุณหภูมิที่ผิวหน้าน้ำแข็งมีค่าต่ำกว่าจุดวิกฤตของก๊าซ ของเหลว และของแข็งอยู่ในสภาวะสมดุล เรียกว่าจุด Triple point คือ ความดัน 611.73 pascals และอุณหภูมิ 0 °C

ในระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ความเครียด (Stress) จะถูกกักตัวให้เกิดขึ้นระหว่างที่มีการเปลี่ยนอุณหภูมิและเฟส ซึ่งมีแนวโน้มจะทำให้โปรตีน เมมเบรนและโครงสร้างอื่น ๆ ของเซลล์จุลินทรีย์เสียหายได้ ซึ่งส่งผลให้ค่า activity ของจุลินทรีย์ลดลง เมื่อถูกนำไปใช้หลังจากผ่านการทำแห้ง ดังนั้นก่อนที่จะได้เป็นผลิตภัณฑ์นั้น จึงควรมีการทดสอบผลของสภาวะการทำแห้งที่มีต่อการอยู่รอดหรือการคงตัวของจุลินทรีย์ ตลอดจนควรมีการศึกษาการใช้สารเพื่อช่วยป้องกันและปกป้องการถูกทำลาย เนื่องจากสภาวะที่เปลี่ยนไป (Mattila-Sandholm et.al., 2002) โดยสิ่งที่มีผลต่อความคงตัวของจุลินทรีย์ที่เป็น probiotics คือ

1. pH ใช้ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ โดยแตกตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน และ ไฮดรอกไซด์ไอออน กรดอินทรีย์มีสมบัติทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดอินทรีย์ เพราะแตกตัวให้ H^+ มากกว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดทนต่อกรดได้แตกต่างกัน เชื้อราและยีสต์ทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรีย กรดแกลูตาเมตและเบสแกลูตาเมตทำลายจุลินทรีย์โดยทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สมบัติการยอมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น เซลล์จึงถูกทำลาย (นงลักษณ์, 2541)

2. สารกันเสีย (Preservatives) ใช้ผสมเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อยีสต์ เพื่อป้องกันไม่ให้เสียง่าย เช่น พาราเบน (parabens) กรดซอร์บิก (sorbic acid) โบร-โนพอล (bronopol) ฯลฯ

3. อุณหภูมิในการเก็บรักษา ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พวก Probiotics คือ 4 °C โดยที่ไม่ต้องเติมสารกันเสียลงไป แต่ถ้าต้องการเก็บที่อุณหภูมิห้องจำเป็นต้องเพิ่มสารกันเสีย โดยสารกันเสียที่ใช้มี 2 ชนิด คือ Sodium benzoate หรือ Potassium sorbate ซึ่งการเลือกใช้สารกันเสียทั้ง 2 ชนิดนี้ จะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งต้องทำการปรับค่า pH ร่วมด้วย โดยสามารถเก็บได้นาน 6 เดือน

ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ต้องอาศัยสารซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อ นำ คือ zeolite talcum และ calcium carbamate ซึ่งสามารถทำให้ใช้อุณหภูมิมากกว่า 150 °C ในกระบวนการทำแห้งได้ ซึ่งไม่ทำให้สปอร์ลดจำนวนลง สปอร์ที่อยู่ในรูปผงหลังจากการทำแห้งด้วยวิธี fixed-tray dry มีความเข้มข้นประมาณ 3×10^8 CFU/g (วาสนา, 2547)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน (Partial freeze-drying)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน เป็นการทำแห้งโดยใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อกำจัดความชื้นในเบื้องต้น จากนั้นจะกำจัดความชื้นอีกครั้งจนเหลือความชื้นที่ต้องการด้วยลมร้อน (Schadle,1983) หรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจนเหลือความชื้น 50% จากนั้นจะให้การให้ความร้อนโดยไม่โครเวฟ และทำแห้งด้วยลมร้อน หรือทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศจนเหลือความชื้น 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอย่างเดียวยพบว่าลักษณะทางด้านคุณภาพของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน และใช้ลมร้อนจะเหมือนกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพียงอย่างเดียว ส่วนการใช้สภาวะสุญญากาศจะให้ดีกว่าการใช้ลมร้อน และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน และลมร้อนจะใช้เวลาในการทำแห้งน้อยกว่าการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพียงอย่างเดียว (Litvin et al.,1998) นอกจากนี้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพียงบางส่วน เป็นการใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งก่อน แล้วเปลี่ยนเป็นการใช้ความร้อนด้วยวิธีการอื่น ๆ ในการกำจัดความชื้นที่เหลือ เปรียบเทียบกับการใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง หรือการใช้ลมร้อนเพียงอย่างเดียว พบว่าการใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนจะให้ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่คล้ายคลึงกับการทำแห้งแช่เยือกแข็งเพียงอย่างเดียว แต่จะประหยัดระยะเวลาในการทำแห้ง และประหยัดพลังงานได้มากกว่า (Phanindra,2001)

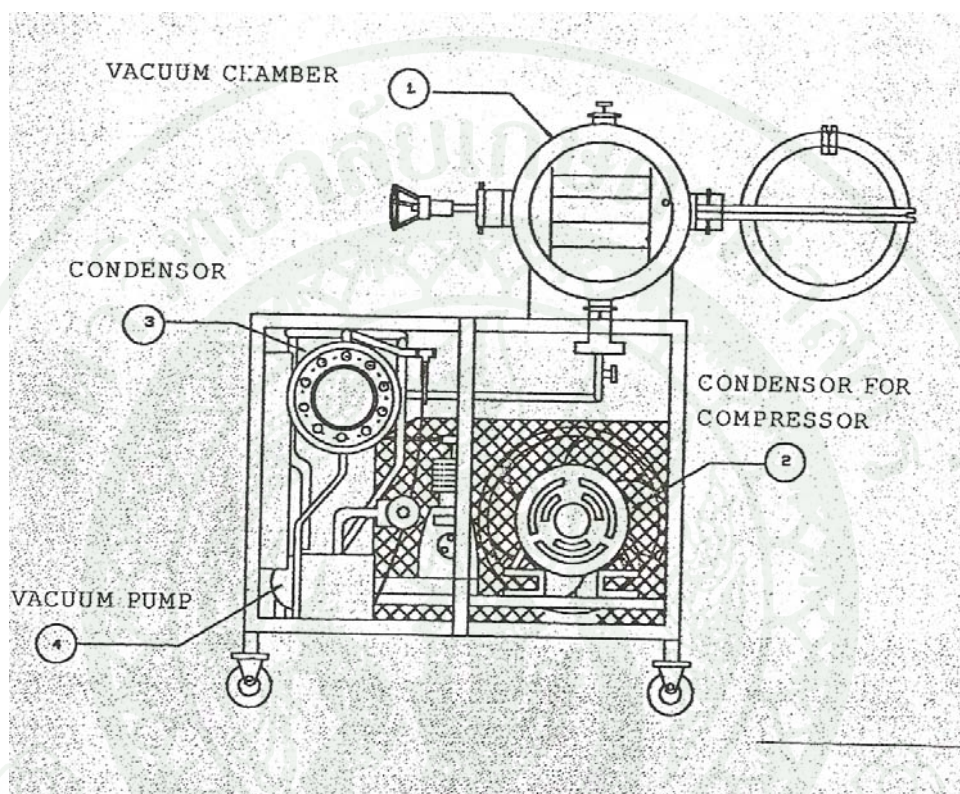
ส่วนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนที่จะใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นการทำแห้งโดยที่จะแยกส่วนของการแช่เยือกแข็ง และส่วนของการทำแห้งออกจากกัน ซึ่งในขั้นแรกจะทำการแช่เยือกแข็งในตู้แช่เยือกแข็งก่อน แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์เข้าห้องอบแห้ง โดยที่จะเป็นการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในขั้นต้นเท่านั้น ส่วนการทำแห้งในขั้นที่สองจะเป็นการทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนประกอบด้วย 3 ส่วน ดังภาพที่ 6

1. ห้องทำแห้ง (Vacuum chamber) เป็นส่วนที่ใช้ทำแห้งผลิตภัณฑ์ ภายในประกอบไปด้วยชั้นให้ความร้อน (Heating Plate หรือ Plate Heater Exchanger) Chamber ทำด้วย Stainless Steel 304 หนา 3 mm สำหรับฝาปิดใช้พลาสติก PVC หนา 15 mm

2. คอนเดนเซอร์ (Condenser) ทำหน้าที่ควบแน่นไอน้ำที่ถูกล้างออกจากผลิตภัณฑ์ให้กลายเป็นน้ำแข็งที่คอยล์เย็น (โดยใช้สารทำความเย็นคือ R22 ซึ่งสามารถทำความเย็นถึงอุณหภูมิ -20 °C)

3. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum Pump) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญมาก เพราะเป็นตัวที่ทำให้เกิดสถานะสุญญากาศในระบบการทำแห้ง โดยใช้ปั๊มสุญญากาศขนาด 0.5 kW มีความเร็วรอบ 2860 รอบ/min



ภาพที่ 6 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน
ที่มา: เชาวน์ (2544)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

การทดลองอบแห้งกับกุ้งกุลาดำ และทุเรียน โดยใช้เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน สำหรับอาหาร ขนาดตัวเครื่อง 900*1200*1150 มิลลิเมตร ใช้ปั๊มสุญญากาศ 0.55 มิลลิเมตรปรอท ขนาด 1 แรงม้าที่สถานะ อุณหภูมิห้อง 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สถานะสุญญากาศ ตามลำดับ พบว่ากุ้งกุลาดำเมื่อทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนเปรียบเทียบกับเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เวลาที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งของกุ้งกุลาดำที่ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน สำหรับอาหารนั้นน้อยกว่าเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และที่การทำแห้งที่อุณหภูมิของ Plate ที่สูงขึ้น เวลาที่ใช้ในกระบวนการจะสั้นลงด้วย สำหรับสมบัติของเนื้อสัมผัสของกุ้งกุลาดำที่ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนสำหรับอาหารนั้น มีลักษณะแข็งกรอบ และมีการยุบตัวมากกว่า

กึ่งกลาคำที่ทำแห้งจากเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาก แต่สามารถรับแรงกดได้น้อยกว่ากึ่งกลาคำที่ทำแห้งจากเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งลักษณะของกึ่งกลาคำที่ทำแห้งจากเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้นจะนิ่ม และเหมือนฟองน้ำมาก ส่วนสีของกึ่งกลาคำที่ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนสำหรับอาหาร พบว่ามีสีแดงเข้มกว่ากึ่งกลาคำด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และสถานะที่ดีที่สุดของการทำแห้งกึ่งกลาคำด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนสำหรับอาหาร คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากเมื่อนำไปทำการกินตัวด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องแล้ว มีสี และเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับกึ่งกลาคำก่อนการทำแห้งที่สุด สำหรับทุเรียนที่ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนพบว่าที่สถานะ อุณหภูมิห้อง 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ทุเรียนที่ได้มีลักษณะแข็งกรอบ และมีการยุบตัว ทุกสถานะ ส่วนสีของทุเรียนนั้นจะมีสีเหลืองเข้มกว่าทุเรียนก่อนการอบแห้ง ทุกสถานะ ซึ่งทุเรียนที่ได้จะยังคงกลิ่นความหอม และรสหวานเหมือนกับทุเรียนสุกทุกประการ (เขาว์, 2544)

การผลิตไวตามินสำหรับสัตว์เศรษฐกิจนั้น มีกรรมวิธีการผลิตที่หลากหลาย แต่กระบวนการหนึ่งที่นิยมคือ การนำไวตามินมาผสมเป็ยกกับสารตั้งต้นแล้วนำไปอบแห้ง โดยในการอบแห้งปัจจุบันเป็นการอบแห้งโดยใช้ลมร้อน ซึ่งอาจจะมีผลกระทบต่อการสูญเสียคุณภาพทางด้านสีและ คุณค่าของไวตามิน ดังนั้นการอบแห้ง โดยใช้เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน หรือ กระบวนการอบแห้งที่เป็นการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งในการอบแห้งช่วงเริ่มต้น และใช้การอบแห้งแบบสุญญากาศในการอบแห้งช่วงสุดท้าย เพื่อลดเวลาในการอบแห้ง ในการศึกษาวิจัยได้แบ่งการอบแห้งเป็นสองส่วน คือการอบแห้งในระดับห้องปฏิบัติการและการอบแห้งของเครื่อง ที่ใช้ในการผลิตจริงในโรงงาน ซึ่งจากผลการทดลองสำหรับการอบแห้งในห้องปฏิบัติการพบว่า การอบแห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนในห้องปฏิบัติการ โดยไม่เปิดแผ่นให้ความร้อนจะมีไวตามินบี 2 เหลือมากที่สุดคือ 57.4 mg/100g ส่วนการเปิดแผ่นให้ความร้อนโดยควบคุมที่ 30° C 40° C และ 50° C นั้นปริมาณไวตามินที่เหลือจะต่ำกว่าการอบแห้งโดยใช้ลมร้อนที่ 45° C คือ 48.3 mg/100 g ส่วนการอบแห้งของเครื่องที่ใช้อบแห้งในการผลิตจริงในโรงงานอุตสาหกรรมและ เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนที่สร้างขึ้น พบว่าการอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่โรงงานมีปริมาณไวตามินบี2 เหลือมากที่สุดคือ 149.57 mg/100g และการอบแห้งโดยให้เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนในโรงงานนั้นมีไวตามินบี 2 เหลือน้อยสุดคือ 68.34 mg/100 ขณะที่เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนในห้องปฏิบัติการและเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนในห้องปฏิบัติการมีไวตามินบี 2 เหลือ 119.67 และ 119.05 mg/100 g ตามลำดับ (เขาว์, 2545)

การศึกษาปัจจัยการพองตัวของมอลต์สกัดจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนพบว่าเมื่ออุณหภูมิของแผ่นความร้อน (T) หรือความชื้นเริ่มต้นของมอลต์สกัด (M) เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราส่วนการขยายตัวของมอลต์สกัด (E_R) เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความสูงเริ่มต้นของมอลต์สกัด (h_0) โดย

ใช้ปริมาตรเท่าเดิมจะส่งผลให้อัตราส่วนการขยายตัวของมอลต์สกัดมีค่าลดลง ซึ่งมีสมการสำหรับทำนายค่าอัตราส่วนการขยายตัวของมอลต์สกัด ดังนี้ $E_R = -33.4139 + 1.5279T + (0.0276T \times M) - (1.2985T \times h_0) - 0.0138T^2 + 57.7120 h_0^2$ ($R^2 = 0.975$) นอกจากนี้ระยะเวลาในการทำแห้งมอลต์สกัดจะนานขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิของแผ่นความร้อน เพิ่มความสูงเริ่มต้นของมอลต์สกัด หรือเพิ่มความชื้นเริ่มต้นของมอลต์สกัด ส่วนทางด้านคุณภาพของมอลต์สกัดแห้งจะศึกษาถึงค่าสี และการละลายของมอลต์สกัดแห้ง พบว่ามอลต์สกัดแห้งมีความสว่าง ΔL มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิของแผ่นความร้อนเพิ่มขึ้น แต่ความสว่างจะลดลงเมื่อความสูงเริ่มต้นของมอลต์สกัดมีค่าสูงขึ้น ส่วนค่าสีน้ำตาลของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ มอลต์สกัดแห้งมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของแผ่นความร้อนเพิ่มขึ้นเท่านั้น สำหรับค่าการละลาย พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของแผ่นความร้อน หรือความชื้นเริ่มต้นของมอลต์สกัด จะทำให้การละลายดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความสูงเริ่มต้นของมอลต์สกัด จะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งมอลต์สกัดในด้านการพองตัวใช้พิจารณาควบคู่ไปกับค่าการละลาย คือ การใช้อุณหภูมิของแผ่นความร้อนที่สูง 50°C ใส่ในภาชนะทำแห้งรูปทรงเตี้ยที่ทำให้มอลต์สกัดมีความสูงน้อย (0.17 cm) และเหมาะสมที่สุดกับการทำแห้งวัตถุดิบที่มีความชื้นเริ่มต้น 30.11 % สำหรับช่วงความชื้นเริ่มต้นที่ทำการศึกษา (รสลิน, 2547)

สารป้องกันความเย็น

สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants, suspending fluids)

สมบุรณ์ (2544) ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บรักษาไม่สามารถคาดเดาได้ว่าสารประกอบประเภทสารป้องกันความเย็นชนิดใดที่ความเข้มข้นระดับใดเหมาะสม สถาบันเก็บรักษาจุลินทรีย์ของสหรัฐอเมริกา (American Type Culture Collection หรือ ATCC) มักใช้ skim milk (Difco) 20% ในน้ำกลั่นบรรจุหลอดละ 6 มล. นำไปใช้ทำให้ปราศจากเชื้อ และผสมกับเชื้อแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ skim milk เป็น 10% อาจใช้ซูโครส 24% ในน้ำกลั่นผสมเชื้อแบคทีเรียปริมาณเท่ากันให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของซูโครสเป็น 12%

สถาบันเก็บรักษาจุลินทรีย์ของอังกฤษ (National Collection of Type Culture หรือ NCTC) ใช้ inositol serum ประกอบด้วย meso-inositol 5% ใน horse serum ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง หรือใช้อาหารอินอซิทอล (inositol broth) ประกอบด้วย nutrient broth 2.5% และ meso-inositol 5% ในน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) มาใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาแบคทีเรียทางอุตสาหกรรมและแบคทีเรียทางทะเลของ National Collections of Industrial Marine Bacteria (NCIMB) ประเทศอังกฤษ ใช้สารผสมระหว่างอาหารเหลว (Oxoid Ltd., No3.) 25 มล. กับซีรัม (Welcome Reagents Ltd, CM1) 75 มล. และกลูโคส 7.5 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน หรือ seitz filtration โดยใช้ความกดดัน บรรจุส่วนผสมนี้ปริมาณ 5 มล. ในหลอดฝาเกลียว บ่มไว้ 5 วัน ที่ 25-30 °ซ เพื่อตรวจสอบการปะปนของเชื้ออื่นก่อนนำไปใช้ ส่วนผสมหนึ่งหลอด ใช้เตรียมชั้นเพลนจากเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้นผิวเอียงได้ 3 หลอด จะให้ความเข้มข้นของเชื้อมากพอโดยนำไปบรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อหลอดละ 0.1 มล. ได้ 25 หลอด

การเก็บรักษาแบคทีเรียผลิตมีเทน (methanogenic bacteria) โดยเฉพาะ Methanobacterium, Methanobrevibacterium และ Methanosarcina จะรอดชีวิตได้มากกว่า Methanococcus และ Methanospirillum ในระยะเวลา 3-4 ปี โดยใช้สารป้องกันความเย็นผสมระหว่างซีรัมม้ากับกลูโคส 7.5% หรือ m-inositol 5% สติมมิลค์ 10% กับ ซูโครส 10% หรือ ซูโครสอย่างเดียว ควรเติม amorphous ferrous sulphide (0.1 มก./มล.) ลงไปด้วยจะช่วยป้องกันออกซิเจน เพราะเชื้อพวกนี้ไม่ต้องการอากาศในการเจริญแต่ไวต่ออากาศ

Suspending fluids ที่เหมาะสมจะช่วยให้แบคทีเรียไม่แห้งเกินควร (overdrying) และป้องกันแบคทีเรียจากความเสียหายทางกล (mechanical) และทางเคมีระหว่างการทำให้แห้งและระหว่างการเก็บรักษา NCTC ใช้อินอซิทอล 5% ในซีรัม สำหรับทุกเชื้อ ยกเว้น enterobacteria มักใช้อินอซิทอลเหลว 5% แทน เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกัน (immunological) หรือมีผลเสียต่อเซลล์ การรวบรวมเซลล์ทำได้โดยใช้ Suspending fluids 1-2 มล. ลงบนเชื้อที่เจริญบนผิวเอียงภายในหลอด เขี่ยเบา ๆ ให้เชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอ ต้องทำด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

ประเภทของสารป้องกันความเย็น

สามารถแบ่งกลุ่มสารป้องกันความเย็นหรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์ตามคุณสมบัติความเป็นกรดหรือเบส การเป็นสารรีดิวซ์และขนาดของโมเลกุล ดังนี้

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยว/คู่จำพวกกรด (acidic based) เช่น กลูตามेट แอสปาราจีน (asparagines) มาเลต (malate) และแอสปาทेट (aspartate)

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยว/คู่จำพวกเป็นกลาง (neutral based) เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส (lactose) ซูโครส แรฟฟิโนส (raffinose) ซอร์บิตอล (sorbitol) ไซลิตอล (xylitol) อินอซิทอล และดีแอล-ทรีโอนีน (DL-threonine)

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยว/คู่จำพวกเบส (basic based) เช่น ไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine)

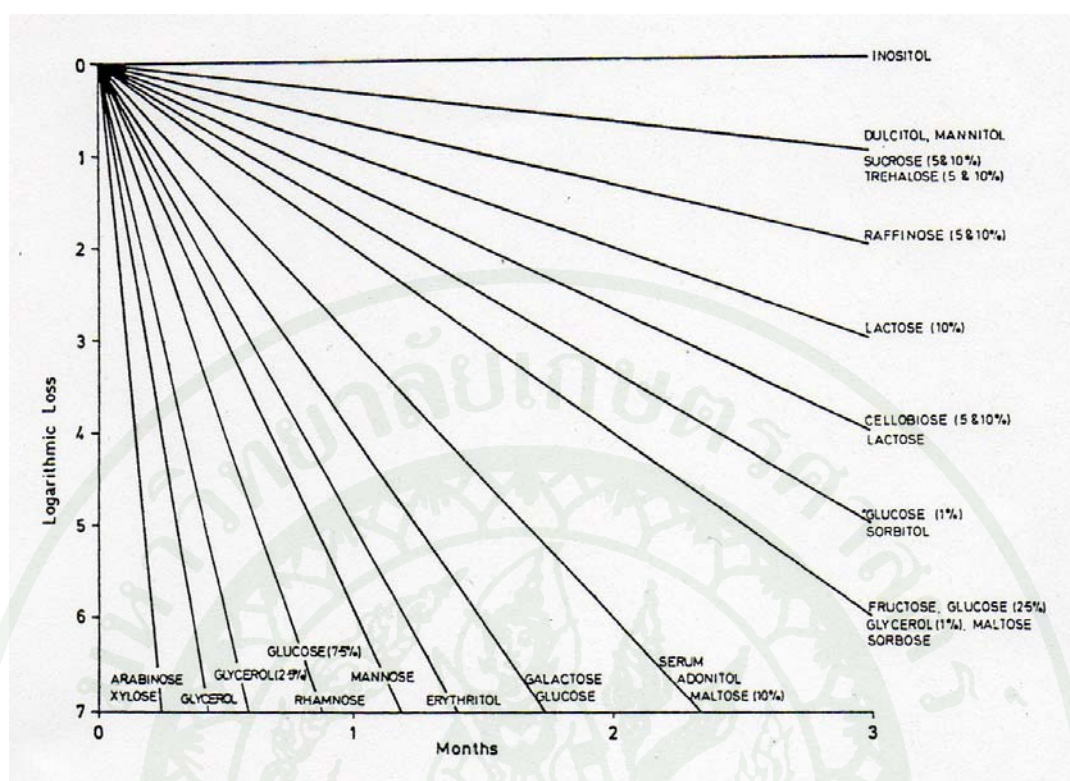
สารประกอบจำพวกพอลิเมอร์และดีเกรเดทีฟ (polymers and its degradatives) เช่น อัลบูมิน (albumin) เจลาติน มิวซิน (mucin) เปปโตน แป้ง เดกสตริน (dextrin) เพคติน (pectin) พอลิเมอร์ของซูโครสเดกสเตรน (dextran) ส่วนสกัดจากเนื้อ ส่วนสกัดจากยีสต์ พอลิไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxy methylcellulose) และฟีคอล (phocol)

สารประกอบธรรมชาติ (natural substance) เช่น สกิมมิลค์ และซีรัม

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

ผลของสารป้องกันความเย็นที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

การเติมสารป้องกันความเย็นนั้นสามารถเลือกใช้ได้แตกต่างกัน โดยอาจเตรียมเป็นสารละลายชนิดเดียวสำหรับผสมกับเชื้อ เช่น สารละลายของสกิมมิลค์ กลูโคส ซูโครส อินอซิทอล เดกสเตรน เจลาติน พอลิไวนิลไพโรลิโดน กลูตาเมต และเปปโตน หรืออาจเตรียมเป็นส่วนผสมของการโบไฮเดรตกับซีรัม การจะเลือกใช้สารชนิดใดและต่อเชื้อประเภทใดนั้น ควรมีการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งเสียก่อน ตัวอย่างเช่นภาพที่ 7 การตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *Haemophilus suis* เมื่อเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งไว้ ณ อุณหภูมิ 45 °C โดยตรวจสอบผลเป็นช่วง ๆ ภายในระยะเวลาสามเดือน การทดลองนี้ใช้คาร์โบไฮเดรตเข้มข้น 5% หรือตามที่ระบุไว้ผสมกับซีรัมของม้า ผลการตรวจสอบพบว่าส่วนผสมของอินอซิทอลกับซีรัมจะทำให้เชื้อรอดชีวิตมากที่สุด แต่ส่วนผสมของอะราบินอส์ไซโลสกับซีรัม (arabinose-xylose-serum) จะทำให้เชื้อรอดชีวิตน้อยที่สุด



ภาพที่ 7 การรอดชีวิตของเชื้อ *Haemophilus suis* ที่เดิมสารป้องกันความเย็นซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือนหลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
ที่มา: สมบูรณ์ (2544)

กิจกรรมของสารป้องกันความเย็นจะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารที่ช่วยป้องกันได้ดีต้องมีหมู่ไฮโดรเจนบอนด์อยู่ในโมเลกุลสามหมู่ หรือมากกว่าและมีหมู่ที่ไอโอไนสได้อยู่ด้วย คือมีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน มีหมู่คาร์บอซีอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาและแกมมา และมีส่วนของโมเลกุลระหว่างหมู่แกมมา คาร์บอซีและหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ พบว่าการเดิมสารจำพวกที่มีหมู่อะมิโน จะมีส่วนลดพิษของอนุพลคาร์บอนิลได้ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ ซึ่งอาจช่วยในการป้องกัน เช่น โซลิตอลมีผลป้องกัน แต่อีริทริทอลไม่มีผลป้องกัน นอกจากนี้ขนาดของโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ เช่น กลูตาเมต มีกิจกรรมสูงเมื่อเทียบกับสารพวกแอลฟาอะมิโนไดคาร์บอซีเลต ซอร์บิตอล สามารถช่วยป้องกันได้แต่แมนนิทอลและคูลซิโดลไม่มีผลในการป้องกัน สิ่งสำคัญซึ่งค่อนข้างซับซ้อนอีกประการหนึ่ง ก็คือ สารป้องกันความเย็นต้องสามารถป้องกันเชื้อแห้งจากผลทางกายภาพระหว่างที่มีสภาวะแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไป เช่น กลีเซอรอล และdimethyl sulfoxide ความเข้มข้น 0.5M จะซึมเข้าสู่เซลล์และช่วยลดความเสียหายเมื่อน้ำถูกขจัดออก สารประกอบขนาดใหญ่ เช่น ซีรัม อัลบูมิน เดกสแทรน และ polyvinylpyrrolidone ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-3} M จะไม่เข้าสู่เซลล์แต่รวมอยู่ที่ผิวของเซลล์ และป้องกัน

การสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงใหม่ เชื้อที่ทำแห้งต้องมีลักษณะเป็นเค้ก (cake) ไม่ควรเป็นผง (powder) การเลือกอาหารที่สมบูรณ์เพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากที่เก็บรักษาไว้นาน ก็จะมีผลทำให้เชื้อรอดชีวิตได้มากขึ้น

การใช้สารป้องกันความเย็นของศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์โดยเฉพาะ ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้สคิมมิลค์ 20% ผสมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% การใช้สารจำพวกนี้ต้องไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้เก็บรักษา และไม่นิยมใช้เก็บรักษาเชื้อที่เจริญได้เฉพาะในอาหารที่ทราบองค์ประกอบทางเคมี (chemically defined media) และอาจใช้สารละลายซูโครส 24% แทนสคิมมิลค์เพื่อเก็บรักษาเชื้อบางจำพวก โดยให้ส่วนผสมของเชื้อมีความเข้มข้นของน้ำตาลช่วงสุดท้ายเป็น 10% สำหรับเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ศูนย์เก็บรักษาเชื้อ National Collection of Type Culture (NCTC) ประเทศอังกฤษนิยมใช้ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส 7.5% เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (รวมทั้งมัยโคพลาสมา) ยีสต์ และรา เชื้อแบคทีเรียซึ่งทำแห้งแบบเยือกแข็งของ NCTC สามารถรอดชีวิตได้สูง

การรอดชีวิตของเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นขึ้นอยู่กับน้ำที่เป็นองค์ประกอบภายในของเซลล์ และผลของปฏิกิริยาของสารป้องกันความเย็นกับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารป้องกันความเย็นจะทำให้ไอเล็กโตรไลต์เป็นกลางไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญเสียไป และสารป้องกันความเย็นยังป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำไปเพาะเชื้อใหม่ การจะเลือกใช้สารป้องกันความเย็นชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับผลการทดลองโดยสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของเครื่องทำความเย็นและเครื่องทำแห้ง การเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งไว้ ณ อุณหภูมิที่ไม่เป็นอันตรายและการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานาน โดยเลือกใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงใหม่อย่างเหมาะสม ก็จะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดเป็นจำนวนมาก

ในขั้นตอนการเตรียมจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปของ Starter ต้องมีการใช้สาร cryoprotectants เพื่อช่วยรักษาสภาพของจุลินทรีย์และลดความเสียหาย เนื่องจากในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จุลินทรีย์จะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมาก ~ -20 ถึง -30°C ก่อน สาร cryoprotectants ที่ใช้จะช่วย stabilize จุลินทรีย์ โดยอาจจะไปช่วย coat ที่เซลล์หรืออาจจะช่วยทำให้เกิด crosslink ของโมเลกุลของสาร protectant เองขึ้น โดยก่อตัวเป็น protective gel นอกจากนี้ในแต่ละ bacterial culture ก็จะมีลักษณะเฉพาะเหมาะสมกับสาร cryoprotectant ที่ไม่เหมือนกัน ก่อนจะนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงต้องมีการศึกษาเลือกใช้ให้ได้สารที่เหมาะสมกับแต่ละสายพันธุ์ โดยทำการทดสอบ ทดลองเป็นแต่ละกรณีไป

ตารางที่ 1 การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งของ NCTC

Genus	No. of Species	No. of Strains	Mean logarithmic counts before drying (BD), after drying (AD) and after storage for various periods (in years)								
			BD	AD	1	5	10	15	20	25	30
<i>Achromobacter</i>	6	9	7.0	7.0	6.9	6.8	(5.5)	+			
<i>Acinetobacter</i>	2	10	7.0	7.0	6.9	6.8	6.7	(6.5)	+		
<i>Actinobacillus</i>	3	19	6.3	6.1	5.6	4.9	4.2	(2.9)			
<i>Actinomadura</i>	3	8	4.6	4.5	4.4	4.3	(3.8)	(3.0)			
<i>Actinomyces</i>	4	13	5.2	4.9	4.5	4.2	3.8	(3.0)	(3.0)	(3.0)	(3.0)
<i>Aerococcus</i>	1	14	5.8	5.7	5.6	5.6	5.5	5.5	(5.1)		
<i>Aeromonas</i>	4	9	7.0	6.7	6.7	6.2	(6.5)				
<i>Alcaligenes</i>	3	7	7.0	6.9	6.6	6.6	(6.3)	+			
<i>Alteromonas</i>	3	8	6.9	6.8	6.6	6.0	(5.5)				
<i>Alysiella</i>	1	1	5.0	5.0	5.0	5.0					
<i>Anaerobic coccus</i>	—	11	6.2	5.7	5.2	4.8	4.5	3.8	(3.5)		
<i>Bacillus</i>	27	70	5.8	5.5	5.4	5.2	5.0	4.8	4.3	(3.0)	+
<i>Bacterionema</i>	1	3	5.3	5.0	5.0	4.0	3.0				
<i>Bacteroides*</i>	5	12	6.4	6.0	5.2	4.4	(3.4)	(3.3)	(3.3)		
<i>Beneckea</i>	4	4	6.3	5.8	4.8						
<i>Bifidobacterium</i>	1	2	6.5	6.5	6.5						
<i>Bordetella</i>	3	26	7.0	6.9	6.7	6.6	6.4	(6.3)	(6.6)		
<i>Brevibacterium</i>	—	2	7.0	7.0	7.0	7.0					
<i>Brucella</i>	5	32	6.8	6.8	6.8	6.5	6.2	5.8	(5.2)		
<i>Butyribacterium</i>	1	1	6.0	6.0	6.0	6.0					
<i>Campylobacter</i>	3	7	6.3	5.4	5.4	5.1	(4.0)	(4.0)			
<i>Capnocytophaga</i>	2	2	5.0	4.0	3.5						
<i>Cardiobacterium</i>	1	3	7.0	6.3	5.7	(4.0)					
<i>Cellulomonas</i>	2	2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	5.0	5.0		
<i>Chromobacterium</i>	3	19	6.7	6.1	5.5	5.2	4.8	4.2	(4.0)		
<i>Citrobacter</i>	2	11	7.0	6.9	6.8	6.6	6.5	6.0	(6.0)		
<i>Clostridium*</i>	18	73	5.0	4.6	4.5	4.2	3.9	3.8	(3.2)	+	+
<i>Comamonas</i>	1	3	7.0	6.7	6.7	6.3	5.7	(6.0)			
<i>Corynebacterium</i>	14	72	6.4	6.1	5.9	5.8	5.4	5.1	4.6	(4.1)	(3.2)
<i>Cytophaga</i>	1	1	7.0	6.0	6.0	6.0	6.0				
<i>Dermatophilus</i>	1	1	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0				
<i>Edwardsiella</i>	1	3	6.7	6.3	6.0	6.0	6.0	(6.0)			
<i>Eikenella</i>	1	2	6.0	6.0	5.5	4.5					
<i>Enterobacter</i>	2	14	6.6	6.6	6.6	6.4	6.3	6.1	(5.6)	(5.0)	(5.0)
<i>Erwinia</i>	1	4	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0				
<i>Erysipelothrix</i>	1	8	6.3	6.1	6.0	5.9	5.6	5.4	(5.5)		
<i>Escherichia</i>	3	36	6.9	6.5	6.3	5.9	5.8	5.6	5.3	(4.0)	(3.7)
<i>Flavobacterium</i>	3	13	7.0	7.0	6.9	6.9	(6.3)	(6.0)	(6.0)		
<i>Francisella</i>	1	1	6.0	6.0	6.0		5.0				
<i>Fusobacterium</i>	2	2	7.0	7.0	6.5	6.0					
<i>Gardnerella</i>	1	2	6.0	5.5	5.0	4.5					
<i>Gemella</i>	1	3	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0				
<i>Haemophilus*</i>	7	19	6.3	5.8	5.1	4.6	3.8	+	+		
<i>Hafnia</i>	1	8	7.0	6.4	6.0	5.6	5.3	4.9	4.6	4.6	+
<i>Kingella</i>	3	8	5.3	5.3	5.0	5.0	(4.5)				
<i>Klebsiella</i>	6	57	6.8	6.8	6.7	6.6	6.5	6.1	(5.9)	(5.8)	
<i>Kluyvera</i>	2	2	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0				
<i>Kurthia</i>	2	3	6.3	5.7	5.3	5.0	4.3				

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Genus	No. of Species	No. of Strains	Mean logarithmic counts before drying (BD), after drying (AD) and after storage for various periods (in years)								
			BD	AD	1	5	10	15	20	25	30
<i>Lactobacillus</i>	3	6	5.7	5.3	5.2	5.0	4.5	(4.6)	(4.6)		
<i>Legionella</i>	4	11	6.1	5.8	5.5						
<i>Leptotrichia*</i>	1	1	6.0	5.0	4.0	3.0	0				
<i>Leuconostoc</i>	1	1	6.0	6.0	6.0	6.0					
<i>Levinea</i>	1	2	7.0	7.0	7.0	7.0					
<i>Listeria</i>	4	15	6.3	6.3	6.1	5.9	5.8	(5.7)	(5.0)		
<i>Micrococcus</i>	3	23	6.1	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	(5.6)	(5.5)	(5.3)
<i>Moraxella</i>	12	25	6.0	6.0	5.8	5.4	(5.1)	(3.7)			
<i>Morococcus</i>	1	1	5.0	4.0							
<i>Mycobacterium*</i>	12	49	5.6	5.4	5.2	5.0	4.6	4.5	(4.0)	(3.7)	(4.0)
<i>Mycococcus</i>	2	2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5				
<i>Neisseria*</i>	9	41	6.6	6.1	5.6	4.9	4.1	(3.0)	(2.3)	+	+
<i>Nocardia</i>	5	10	6.1	6.0	5.9	5.9	5.7	+	+		
<i>Pasteurella</i>	5	28	6.9	6.8	6.2	5.8	5.6	5.4	(5.5)	+	
<i>Pediococcus</i>	1	2	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0				
<i>Peptococcus*</i>	2	2	6.0	6.0	+	+					
<i>Plesiomonas</i>	1	3	7.0	6.0	6.0	5.7	5.7	(5.0)			
<i>Propionibacterium</i>	2	2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5				
<i>Proteus</i>	4	22	6.7	6.6	6.6	6.6	6.5	6.5	(6.3)		
<i>Providencia</i>	—	10	7.0	6.8	6.7	6.3	6.2	6.0	(5.6)	+	+
<i>Pseudomonas</i>	12	31	6.8	6.4	6.1	5.5	5.0	4.5	(4.1)	+	+
<i>Ramibacterium</i>	1	1	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0				
<i>Rhodococcus</i>	5	14	6.5	6.5	6.4	6.3	6.1	6.0	(5.8)	(5.0)	(5.0)
<i>Rothia</i>	2	3	6.0	6.0	6.0	5.7					
<i>Salmonella</i>	—	131	7.0	6.5	6.2	5.8	5.4	5.1	4.9	4.7	4.4
<i>Sarcina</i>	1	1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0			
<i>Serratia</i>	1	12	6.9	6.8	6.8	6.8	6.5	6.4	(6.0)		
<i>Shigella</i>	4	63	6.9	6.7	6.5	6.1	5.8	5.6	5.5	5.1	+
<i>Simonsiella</i>	1	1	4.0	4.0	3.0	3.0	3.0				
<i>Sphaerophorus</i>	2	4	6.8	6.8	6.3	6.0					
<i>Spirillum*</i>	1	1	7.0	4.0	3.0	2.0					
<i>Staphylococcus</i>	3	48	6.3	6.1	6.1	6.0	5.9	5.8	5.6	5.3	(4.6)
<i>Streptobacillus</i>	1	2	4.5	4.5	4.0						
<i>Streptococcus</i>	12	75	6.0	5.8	5.7	5.5	5.1	5.0	4.7	4.5	(3.4)
<i>Streptomyces</i>	5	9	4.1	3.7	3.7	3.6	3.5	(3.8)	(3.5)		
<i>Thermoactinomyces</i>	1	1	4.0	4.0	4.0	4.0					
<i>Vibrio</i>	5	23	7.0	6.6	6.0	5.4	5.0	4.6	(3.8)	+	
<i>Yersinia</i>	2	20	6.6	6.6	6.4	6.4	6.2	5.9	+		
<i>Zooglea</i>	1	1	7.0	7.0	7.0	6.0	5.0				

ที่มา: สมบูรณ์ (2544)

1. แลคโตส (Lactose or milk sugar)

แลคโตส (Lactose or milk sugar) แลคโตสหรือน้ำตาลนม เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ กลูโคสและกาแลคโตส เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญพบในน้ำนมเพียงอย่างเดียวเท่านั้น แลคโตส สังเคราะห์ขึ้นในเต้านม น้ำนมจะมีแลคโตสเฉลี่ยประมาณ 4.8 เปอร์เซ็นต์ แลคโตสมีความสำคัญในอุตสาหกรรมนม เนื่องจากแลคโตสถูกทำให้สลายตัวได้ง่ายโดยแบคทีเรีย แล้วทำให้เกิดกรดแลคติก ซึ่งทำให้น้ำนมมีรสเปรี้ยว แลคโตสซึ่งผลิตเป็นการค้าเตรียมได้จาก เวย์ (Whey) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำเนยแข็ง

ประโยชน์ของแลคโตส

- ช่วยในการสร้างเซลล์สมองของเด็กอ่อน
- ใช้ในการทำยาเม็ด และยาชนิดแคปซูล
- เป็นตัวควบคุมการ fermentation ของผลิตภัณฑ์นม เพราะแลคโตสเป็นแหล่งอาหารอย่างดีสำหรับจุลินทรีย์
- ทำให้เกิดสีและกลิ่นในผลิตภัณฑ์นมและขนมปัง เนื่องจากแลคโตส เมื่อถูกความร้อนจะให้น้ำตาล (caramel) หรือปฏิกิริยาที่เรียกว่า Maillard reaction ปฏิกิริยาเมลลาร์ด คือ ปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาล โดยมีความร้อนสูงตั้งแต่ 100° ซ. หรือ 212 °ฟ. โดยประมาณ เป็นตัวเร่งเหมือนกับปฏิกิริยา Caramelization ซึ่งเป็นการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง Maillard reaction เป็นการเกิดปฏิกิริยาโดยกลุ่มคาร์บอนในน้ำตาลทำปฏิกิริยากับ nucleophilic ของกรดอะมิโน ซึ่งส่งผลให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่มีลักษณะพิเศษ โดยเป็นปฏิกิริยาหลักของการให้กลิ่นและรสชาติในกระบวนการอุตสาหกรรม ในกระบวนการผลิตจะเกิดกลิ่นรสที่แตกต่างกันออกไปเนื่องจากชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดกลิ่นรสใหม่ๆ ขึ้นมา ปฏิกิริยา maillard แต่ละชนิดของอาหารจะมีกลิ่นรสที่มีลักษณะเฉพาะต่างกันซึ่งเทียบได้กับกลิ่นรสสังเคราะห์ที่นักวิทยาศาสตร์คิดค้นขึ้นมา
- ใช้เป็นตัวนำให้แลคโตส ในนมข้นหวานตกตะกอนได้เร็วขึ้น เพราะถ้าแลคโตสตกตะกอนไม่หมดเวลานำมารับประทานจะรู้สึกสากลิ้น (sandy)
- ใช้เป็นส่วนประกอบของ media ในการเลี้ยงเชื้อรา penicilin

2. กลูโคส (Glucose ชื่อย่อ : Glc)

กลูโคสหรือน้ำตาลเดกซ์โตรส เป็นสารให้ความหวานโมเลกุลเดี่ยวจากธรรมชาติ สามารถพบได้ในผลไม้ เช่น องุ่น เป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่ม คาร์โบไฮเดรตด้วยกัน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และสารเผาผลาญขั้นกลาง (metabolic intermediate) มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าซูโครสซึ่งได้มาจากอ้อยหรือหัวบีทรูท จึงทำให้มีความหวานน้อยกว่าซูโครส กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตหลักของกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) โครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของ D-glucose จะอยู่ในสถานะของแข็งที่เรียกว่า เดกซ์โตรส (dextrose) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร

การผลิต (Production)

จากธรรมชาติ (Natural)

1. กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตของการสังเคราะห์แสงในพืช และสิ่งมีชีวิตจำพวก โปรแคริโอต
2. ในสัตว์และเชื้อรา เกิดจากการแยกสลายไกลโคเจน โดยกระบวนการที่รู้จักกันในชื่อ การสลายไกลโคเจน (Glycogenolysis) ในพืชจะเป็นการแยกสลายซัคเคอเรต คือ แป้ง
3. ในสัตว์กลูโคสจะถูกสังเคราะห์ในตับและไต จากสารขั้นกลาง (intermediates) ที่ไม่ใช่ คาร์โบไฮเดรต (non-carbohydrate) เช่น ไพรูเวต (pyruvate) และ กลีเซอรอล (glycerol) โดยกระบวนการที่เรียกว่า กลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis)

การผลิตเพื่อการค้า (Commercial)

กลูโคสสามารถผลิตเป็นการค้าได้โดยการ ไฮโดรไลซิสแป้งที่มีเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยา พืชผักมากมายสามารถใช้เป็นแหล่งของแป้งได้เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันเทศ มันสำปะหลัง (cassava) ต้นไม้เท้าขม (arrowroot) และ สาเก การใช้แป้งจากพืชจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆของโลก ใน USA แป้งส่วนใหญ่จะเป็น แป้งข้าวโพด (จากต้นข้าวโพด) ในประเทศแถบเอเชียอย่างประเทศไทย จะใช้ข้าวทำแป้งเช่น แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียว

กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ช่วยจะมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนแรกใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 100 °C เอนไซม์เหล่านี้จะไฮโดรไลซ์แป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เล็กลง โดยจะมีโมเลกุลของกลูโคส 5-10 หน่วย ความผิดปกติของกระบวนการจะอยู่ที่การต้มส่วนผสมของแป้งที่อุณหภูมิ 130 °C หรือร้อนกว่านี้ หนึ่งครั้งหรือมากกว่า การใช้ความร้อนระดับนี้เพื่อช่วยการละลายของแป้งในน้ำแต่ความร้อนระดับนี้ก็จะทำลายฤทธิ์เอนไซม์ ซึ่งจะต้องเติมเอนไซม์เข้าไปใหม่ในการต้มแต่ละครั้ง

2. ขั้นตอนที่สองเรียกว่า แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ขั้นตอนนี้จะไฮโดรไลซ์แป้งบางส่วนและไฮโดรไลซ์กลูโคสอย่างสมบูรณ์โดยใช้เอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จาก เชื้อราแอสเพอร์จิลลัสไนเจอร์ (*Aspergillus niger*) สภาพของปฏิกิริยาจะต้องควบคุมให้อยู่ที่ pH 4.0–4.5, 60 °C, และความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจะต้องอยู่ที่ 30–35% โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวะการหมักเหล่านี้ แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสประมาณ 96% หลังจากใช้เวลา 1–4 วัน ถ้าจะให้ผลผลิตสูงกว่านี้สามารถทำได้โดยการทำให้สารละลายจางลง แต่จะต้องใช้หม้อต้มที่ใหญ่กว่าและต้องการน้ำมากกว่าซึ่งสรุปแล้วไม่ประหยัดกว่า สารละลายกลูโคสที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกรอง และเคี้ยวให้งวดใน เครื่องระเหยเอนกประสงค์ (multiple-effect evaporator) ดี-กลูโคสที่เป็นของแข็งจะทำได้โดย การตกผลึก (crystallization)

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทางเคมีของกลูโคส

กลูโคส	
$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	
Chemical name	6-(hydroxymethyl)oxane-2,3,4,5-tetrol
Synonym for D-glucose	dextrose
Varieties of D-glucose	α -D-glucose; β -D-glucose
Abbreviations	Glc
สูตรโมเลกุล	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
น้ำหนักโมเลกุล	$180.16 \text{ g mol}^{-1}$
จุดหลอมเหลว	α -D-glucose: 146°C β -D-glucose: 150°C

ที่มา: Wikipedia (2006)

3. ซูโครส (Sucrose)

มีชื่อธรรมชาติสามัญว่า น้ำตาลทราย (table sugar) เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประเภทไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ซูโครส 1 โมเลกุล จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือ โมโนแซคคาไรด์ (monosaccharides) 2 โมเลกุลซึ่งได้แก่กลูโคสและฟรุคโตส

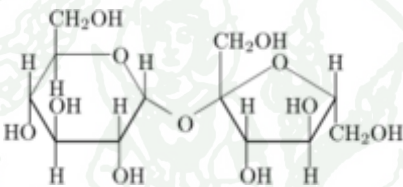
องค์ประกอบ(Composition)

ซูโครสประกอบด้วยโมเลกุลของ กลูโคส(glucose) 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกับโมเลกุลของ ฟรุคโตส(fructose) 1 โมเลกุล ด้วยโควาเลนต์บอนด์ที่ชื่อว่าไกลโคซิดิกบอนด์ (glycosidic bond) สูตรเคมีของซูโครส คือ $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ และชื่อเคมีคือ β -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-glucopyranoside. (α (1-2) pronounced alpha-one-two)

การผลิต (Production)

ในประเทศไทยและประเทศในแถบเมืองร้อนสามารถผลิตซูโครสในระดับอุตสาหกรรมได้จาก อ้อย (sugar cane) ส่วนประเทศในแถบเมืองหนาวจะใช้ หัวบีทเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต น้ำตาลที่ได้จากอุตสาหกรรมเหล่านี้นั้นเรียกว่า "น้ำตาลทราย" โดยระหว่างกระบวนการผลิตจะถูกทำให้ขาวโดยการฟอกสีและนำไปตกผลึก (crystallized) ก่อนที่จะบรรจุเพื่อส่งจำหน่าย

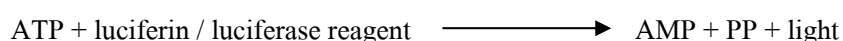
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลทางเคมีของซูโครส

ซูโครส	
	
ชื่อทางเคมี	ซูโครส
สูตรเคมี	$C_{12}H_{22}O_{11}$
มวลโมเลกุล	342.3 g/mol
ความหนาแน่น	1.587 g/cm ³
จุดหลอมเหลว	186 °C

ที่มา: Wikipedia (2006)

การตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์

ATP คือ Adenosine Triphosphate (ATP) เป็นสารซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งระดับของ ATP สามารถบ่งชี้ระดับของ Activity ได้ ดังนั้นการวัดระดับ ATP จึงบ่งชี้ถึง Activity ได้



โดยวิธีการที่เหมาะสม ปฏิกริยาดังกล่าวก็สามารถจะทำให้เกิดแสง ซึ่งสามารถวัดปริมาณ ATP จากแสงซึ่งถูกปล่อยออกมาจากการเกิดปฏิกริยาข้างต้นได้อย่างแม่นยำ ความเข้มของแสงซึ่งปล่อยออกมาจากตัวอย่างจะแสดงค่าวัดในหน่วย Relative Light Unit (RLU) หรือ log 10 ของ RLU โดยค่า

RLU จะแปรผันตรงกับปริมาณ ATP ของตัวอย่างทดสอบ และจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ Activity ของ จูลินทรีย์ (เมอร์ค, 2545)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ต้นแบบ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 จาก ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth และ MRS Agar ยี่ห้อ MERCK ประเทศเยอรมัน
3. แกล็คโตส (Food Grade) ยี่ห้อ Bakery lands ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. กลูโคส (Food Grade) บริษัท ไทยกลูโคส จำกัด ผลิตในประเทศไทย
5. ซูโครส (Food Grade) บริษัท เริ่มอุดมน้ำตาลทราย จำกัด ผลิตในประเทศไทย
6. แคลเซียมคาร์บอเนต ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี
7. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน (Partial Freeze Dryer) (เซาว์, 2544) ดังภาพที่ 3
8. ตู้เย็นแช่แข็ง Whirlpool, รุ่น WRN-16L ดังภาพที่ 4
9. เครื่องวัด ATP รุ่น HY-Lite 2 ยี่ห้อ MERCK ประเทศเยอรมัน ดังภาพที่ 5
10. ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รุ่น UM-100 ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน
11. เครื่องชั่ง รุ่น Sartorius analytic ยี่ห้อ Sartorius ประเทศเยอรมัน
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) รุ่น LAC-5040S ยี่ห้อ Daihan ประเทศเกาหลี
13. หลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิดขนาด 14 ml สำหรับใส่วัตถุใด ๆ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm ความสูง 12 cm ดังภาพที่ 6
14. โถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน
15. จานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ
16. ปิเปตปลอดเชื้อ



ภาพที่ 8 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน



ภาพที่ 9 ตู้เย็นแช่แข็ง Whirlpool, รุ่น WRN-16L



ภาพที่ 10 เครื่องวัด ATP



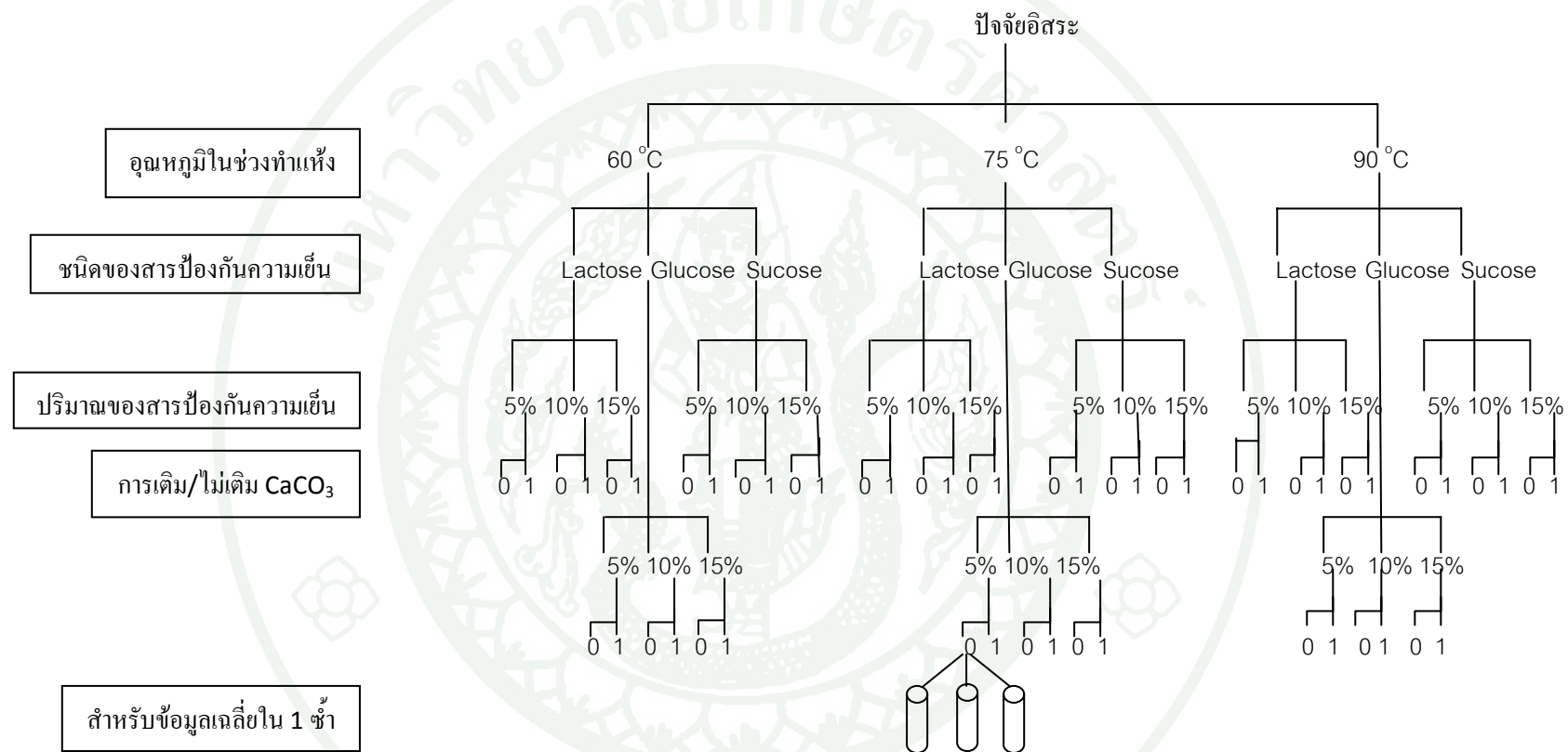
ภาพที่ 11 หลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิดขนาด 14 ml สำหรับใส่วัตถุติด ซึ่งมีย่านเส้นผ่าน ศูนย์กลาง
1.5 cm

วิธีการ

1. การวางแผนการทดลอง

การทดลองนี้จะทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ด้วยวิธีการทำแห้งแช่เยือกแข็งบางส่วนแบบ Batch Method โดยวางแผนการทดลองแบบ $3 \times 3 \times 3 \times 2$ Factorial Experimental in Completely Randomized Design และในแต่ละการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษามี 4 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส) สารป้องกันความเย็น หรือ Cryoprotectant (Lactose, Glucose และ Sucrose) ปริมาณความเข้มข้นชนิดละ 3 ระดับ (5, 10, และ 15 เปอร์เซ็นต์) และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium Carbamate) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ผล โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ซึ่งจะช่วยให้ได้สารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมเฉพาะกับจุลินทรีย์สายพันธุ์และปัจจัยกระบวนการผลิต

แผนการทดลองสำหรับตัวแปรอิสระ (ภาพที่ 12) ซึ่งคือ อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดของสารป้องกันความเย็น ปริมาณความเข้มข้นของสารป้องกันความเย็น และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 12 แผนการทดลองของตัวแปรอิสระทั้ง 4 ตัวแปร

หมายเหตุ ใน 1 ชั่วโมง ตัวอย่างจะถูกเตรียมขึ้นเพื่อใช้เก็บข้อมูลจาก 3 หลอดทดลอง

0 หมายถึง ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต, 1 หมายถึง เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ลักษณะการวางหลอดพลาสติกใส่วัตถุในเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนเป็นดัง
ภาพที่ 8 โดยจะวางหลอดทดลองพลาสติกใส่วัตถุ 3 แถว แถวละ 6 หลอด เรียงต่อกันในการทำแห้ง 1
ครั้ง



ภาพที่ 13 การวางหลอดทดลองพลาสติกใส่วัตถุในเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

ในการทดลองจะมีการศึกษาที่ตัวแปรของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 3 ระดับ คือ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส สารป้องกันความเย็น หรือ Cryoprotectant 3 ชนิด คือ Lactose, Glucose และ Sucrose ปริมาณความเข้มข้นชนิดละ 3 ระดับ คือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium Carbamate)

2. การทดสอบอบแห้งเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* เบื้องต้นด้วยเครื่อง Partial Freeze Dryer

จากการทำการทดลองในการทดสอบอบแห้งเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ในเบื้องต้นนั้น จะทำเพื่อศึกษาระยะเวลาการทำแห้งโดยประมาณ ซึ่งใช้อุณหภูมิทำแห้งที่ 60, 75 และ 90

องศาเซลเซียส โดยห้องอบแห้งจะมีความดันประมาณ 0-200 mbar ใช้หลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 14 ml ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดทดลองคือ 1.5 เซนติเมตร เป็นภาชนะสำหรับสารตัวอย่าง 10 ml เมื่อทำการอบแห้งจะได้ผลตามตารางที่ 4 และ 5 เมื่อทำการอบแห้งจนเหลือความชื้นสุดท้ายต่ำกว่า 18 % ใช้เวลานาน 48 ชั่วโมง การระเหยของน้ำในระหว่างการอบแห้งแสดงดังภาพที่ 9

การหาความชื้นของผลิตภัณฑ์ (มาตรฐานแห้ง)

นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนมาทดสอบหาความชื้น ตามวิธีการดังนี้

1. นำ Moisture can ไปอบที่ 100 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง โดยขณะอบให้เปิดฝา
2. นำ Moisture can ที่อบแล้ว ปิดฝา ใส่ desiccators ทิ้งไว้ให้เย็น
3. ชั่งน้ำหนัก Moisture can ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก
4. ชั่งตัวอย่าง จำนวน 2-5 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ Moisture can
5. นำไปอบที่ 105 °C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่
6. นำออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักที่หายไป บันทึกผล
7. คำนวณหาความชื้นในตัวอย่าง ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}} \times 100$$

3. ขั้นตอนการศึกษาการอบแห้งเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ด้วยเครื่อง Partial Freeze

Dryer

3.1 ศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่แตกต่างกัน 3 ระดับ การใช้สารป้องกันความเย็น 3 ชนิด ชนิดละ 3 ระดับที่มีผลกับจุลินทรีย์ probiotics ระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 จะทำการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาความคงตัวของจุลินทรีย์ภายใต้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 3 ระดับ คือ 60, 75 และ 90 °C

สารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant) ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่

- แลคโตส ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
- กลูโคส ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
- ซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างที่มีการเติมสารป้องกันความเย็น ดังนี้

- นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 14 ml หลอดละ 10 ml
- เติมแลคโตสที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมแลคโตสที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมแลคโตสที่ระดับความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติม ซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติมซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จำนวน 3 หลอด
- เติม Starter ลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth หลอดละ 1 ml

3.1.2 นำไปแช่เยือกแข็งในตู้แช่เยือกแข็งเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.1.3 นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ที่อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60, 75 และ 90 °C ความดัน 0-200 mbar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ

3.1.4 ตรวจวัด Activity test ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน โดยการตรวจวัดปริมาณ ATP และตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์

3.2 ศึกษาผลของการใช้ calcium carbonate ที่มีผลกับจุลินทรีย์ probiotics ระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 จะทำการศึกษาถึงการใส่ calcium carbonate ร่วมกับสารป้องกันความชื้นที่เหมาะสม และตรวจสอบ Activity test ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน โดยการตรวจวัดปริมาณ ATP

3.2.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 14 ml หลอดละ 10 ml

3.2.2 เติมสารป้องกันความชื้น (แลคโตส, กลูโคส และซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ชนิดและระดับความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.2.3 เติม calcium carbonate ด้วยอัตราส่วน 1:1 (v/w) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth 10 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารป้องกันความชื้น ต่อ calcium carbonate 10 กรัม

3.2.4 เติม Starter ลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth หลอดละ 1 ml

3.2.5 นำไปแช่เยือกแข็งในตู้แช่เยือกแข็งเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.2.6 นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ที่อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60, 75 และ 90 °C ความดัน 0-200 mbar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ

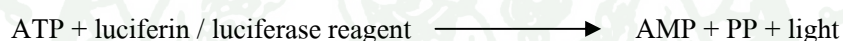
3.2.7 ทำการทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลัง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

4. การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus*

การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ จะทำการทดสอบด้วยการตรวจสอบค่า Activity test และนับจำนวนจุลินทรีย์โดยมีการทดสอบดังนี้

4.1 การตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์

ATP คือ Adenosine Triphosphate (ATP) เป็นสารซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งระดับของ ATP สามารถบ่งชี้ระดับของ Activity ได้ ดังนั้นการวัดระดับ ATP จึงบ่งชี้ถึง Activity ได้



โดยวิธีการที่เหมาะสม จากปฏิกิริยาดังกล่าวก็สามารถจะทำให้เกิดแสง ซึ่งสามารถวัดปริมาณ ATP จากแสงซึ่งถูกปล่อยออกมาจากการเกิดปฏิกิริยาข้างต้นได้อย่างแม่นยำ ความเข้มของแสงซึ่งปล่อยออกมาจากตัวอย่างจะแสดงค่าวัดในหน่วย Relative Light Unit (RLU) หรือ $\log_{10}$ (RLU) โดยค่า RLU จะแปรผันตรงกับปริมาณ ATP ของตัวอย่างทดสอบ และจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ Activity ของจุลินทรีย์

4.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์

4.2.1 ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 3 ระดับ (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำการทดสอบ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง

4.2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลอมเหลวอุณหภูมิ 45°C . ลงในจานที่มีตัวอย่าง จานละ 15 มิลลิลิตร หมุนจานเพื่อผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้แข็งตัว

4.2.3 ป่มจานอาหารในโถเพาะเชื้อไร้อากาศที่อุณหภูมิ 35°C . เป็นเวลา 3-4 วัน

4.2.4 จะได้โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว หรือสีครีม นับจำนวนโคโลนี ของแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณ CFU ต่อกรัม

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา บริษัท แหลมทองผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด เลขที่ 87 หมู่ 9 ถนนพหลโยธินสาย 5 ตำบลไร่ขิง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

6. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2551 ถึงวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2553

ผลและวิจารณ์

ผลของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติมสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัย 4 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (ที่ 60, 75 และ 90 °C) ชนิดของสารป้องกันความเย็น (แลคโตส, กลูโคส และซูโครส) ปริมาณการเติมสารป้องกันความเย็น (5, 10 และ 15 %) และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนนั้น ตรวจสอบโดยการวัดค่า Adenosine Triphosphate (ATP) ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับ activity ของจุลินทรีย์

1. ผลของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

สำหรับการทดลองในส่วนนี้ได้เลือกใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60-90 °C เนื่องจากจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์สูงขึ้นถ้าทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำและเวลานาน ซึ่งอุณหภูมิในช่วงนี้ Wang (2003) ได้ใช้กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้ความชื้นหลังจากการทำแห้งอยู่ระหว่าง 3.2-3.5 % (wb) และการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* หลังการทำแห้งอยู่ระหว่าง 44-50.3 % การทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์สูง แต่เพื่อให้ความชื้นหลังจากการทำแห้งลดลงจึงต้องใช้ระยะเวลาาน ซึ่งการใช้เวลานานทำให้สิ้นเปลืองพลังงานที่ใช้ในการทำแห้ง จากการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมด้วยจะทำให้ความชื้นลดลงตามตารางที่ 4 และ 5 นอกเหนือจากการทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีความทนทานต่อความร้อนมากขึ้นจึงใช้อุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตมีคุณสมบัติเป็น carrier ละลายในน้ำได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ช่วยนำพาสารอาหาร และช่วยในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบให้กระจายตัวอย่างทั่วถึง จึงอาจก่อให้เกิดโครงสร้างในสารตัวอย่างที่ช่วยปกป้องจุลินทรีย์จากการ

ถ่ายเทความร้อน หรือใช้เป็นที่พักบัง(shelter)ได้ จากตารางที่ 4 พบว่าอุณหภูมิในช่วงนี้ทำให้ความชื้นสุดท้ายหลังจากการทำแห้งของตัวอย่างเมื่อไม่ได้เติมแคลเซียมคาร์บอเนต อยู่ระหว่าง 4.85-19.3 % ต่อน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความชื้นจะอยู่ระหว่าง 4.38-15.27 % ต่อน้ำหนักแห้ง นอกจากอุณหภูมิจะมีผลต่อการทำแห้งแล้ว ความชื้นก็มีผลต่อความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา ถ้ามีความชื้นมากกว่า 18 % จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของราอย่างรวดเร็วในระหว่างการเก็บรักษา เช่น ถ้าผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรียมีความชื้นมากกว่า 18 % จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีจำนวนสปอร์ของแบคทีเรียลดลงและเกิดการปนเปื้อนของราอย่างรวดเร็วในระหว่างการเก็บ (Junge และคณะ, 2002) ดังนั้นการทดลองนี้จะใช้เวลาในการอบแห้งจนผลิตภัณฑ์มีความชื้นต่ำกว่า 18 % ซึ่งระยะเวลาที่เลือกใช้ในการทำแห้งของการทดลองนี้คือ 48 ชั่วโมง เนื่องจากจากตารางที่ 5 เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต หลังจากการทำแห้งความชื้นจะลดลงต่ำกว่า 18% เพราะแคลเซียมคาร์บอเนตมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ มีความชื้นเป็น 0 % (www.thaimarble.co.th) ทำให้ตัวอย่างที่มีวัตถุแห้งเพิ่มขึ้น

จากภาพที่ 15-17 ในการทดลองนี้พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* เมื่อไม่มีการเติมสารป้องกันความเย็นและแคลเซียมคาร์บอเนต หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอยู่ระหว่าง 0.08-2.3% และมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 1.58×10^5 - 3.60×10^6 CFU/ml จะสังเกตได้อีกว่าเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งเพิ่มขึ้นจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง เมื่อมีการใช้สารป้องกันความเย็น 5-15 % การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเพิ่มขึ้นมาอยู่ระหว่าง 0.09-70.13 % และมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 4.80×10^5 - 7.90×10^7 CFU/ml จากภาพที่ 18-20 แต่เมื่อมีการใช้สารป้องกันความเย็น 5-15 % และแคลเซียมคาร์บอเนต การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเพิ่มขึ้นมาอยู่ระหว่าง 5.87-99.65 % และมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 7.90×10^5 - 1.43×10^8 CFU/ml ซึ่งสภาวะที่ทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* มากที่สุดคือ การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส และเติมแลคโตส 15 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต ทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 99.63-99.69 % และมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 1.42×10^8 - 1.44×10^8 CFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 20

อย่างไรก็ตามจากการทดลองของวาสนา (2546) สปอร์ที่อยู่ในรูปผงหลังจากการทำแห้งด้วยวิธี fixed-tray dry มีความเข้มข้นประมาณ 3×10^8 CFU/g ซึ่งมากกว่าการทดลองนี้เนื่องจากความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการทำแห้งเริ่มต้นไม่เท่ากัน ซึ่งความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการทำแห้งในการ

ทดลองของวาสนามีความเข้มข้นประมาณ 2.47×10^9 CFU/ml ส่วนในการทดลองนี้มีความเข้มข้นประมาณ 1.77×10^8 CFU/ml นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งเพิ่มขึ้นจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ลดลงที่ทุกเปอร์เซ็นต์ของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ เช่น การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเติมแลคโตสเป็นสารป้องกันความเย็น 5 % ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ตัวอย่างหลังจากการทำแห้งที่อุณหภูมิ 60, 75 และ 90 °C มีเปอร์เซ็นต์ลดลงตามลำดับดังนี้ 66.06, 22.99 และ 13.37 % มีจำนวนจุลินทรีย์ 1.42×10^8 , 2.74×10^7 และ 3.02×10^7 ตามลำดับ ส่วนการเติมซูโครส 5 % ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ตามลำดับดังนี้ 3.86, 0.80 และ 0.32 % มีจำนวนจุลินทรีย์ 5.90×10^6 , 1.13×10^6 และ 7.90×10^5 ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิมีผลทำให้ปฏิกิริยาทางเคมีจะเร็วขึ้น ตัวอย่างที่ได้รับอุณหภูมิสูงอาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (nonenzymatic browning) จากปฏิกิริยาที่เรียกว่า Maillard reaction (a carbonylamine reaction) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสูญเสียกิจกรรมทางชีววิทยาของโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตขณะถูกคั่งน้ำออกไป นอกจากการเปลี่ยนสีแล้วอาจเกิดสารที่มีกลิ่นแรงในปฏิกิริยา เนื่องจากโปรตีนถูกแปลงสภาพ (protein denature) เมื่อมีการสูญเสียน้ำออกไปจากโครงสร้างและบอนด์ยึดเหนี่ยวที่เปลี่ยนแปลง และยังทำให้สารอาหารเช่น วิตามินซี เป็นต้น ถูกทำลาย (nutrient destruction) ในตัวอย่างที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวก็จะไวต่อออกซิเจนและการสลายของกรดนิวคลีอิก จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยเฉพาะในจุลินทรีย์ได้ด้วย (สมบุญ, 2544)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนการเติม Calcium carbonate ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อน้ำหนักแห้ง)		
	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	60	75	90
24	75.86±2.69	71.69±3.95	71.16±1.37
36	63.25±1.99	47.96±0.66	34.49±2.67
48	19.3±2.09	11.83±0.66	4.85±1.93

หมายเหตุ ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจาก 1 ซ้ำ ตัวอย่างจะถูกเตรียมขึ้นเพื่อใช้เก็บข้อมูลจาก 3 หลอด ทดลอง

ตารางที่ 5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างเมื่อทำการเติม Calcium carbonate

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อน้ำหนักแห้ง)		
	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	60	75	90
24	64.14±1.42	58.83±3.68	48.84±0.57
36	47.66±3.45	36.75±3.58	26.36±3.48
48	15.27±2.8	9.2±1.28	4.38±0.24

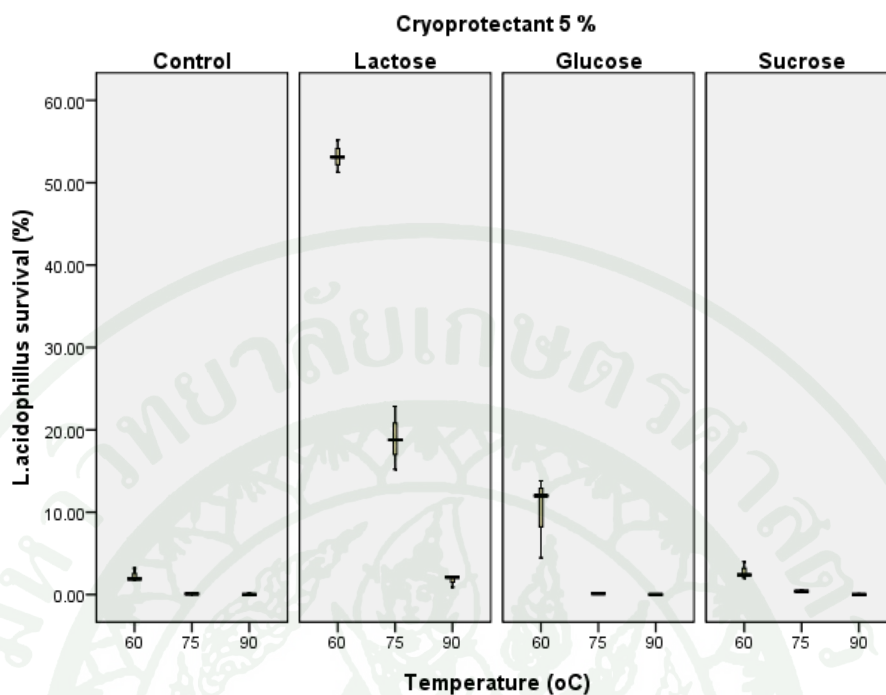
หมายเหตุ ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจาก 1 ซ้ำ ตัวอย่างจะถูกเตรียมขึ้นเพื่อใช้เก็บข้อมูลจาก 3 หลอดทดลอง



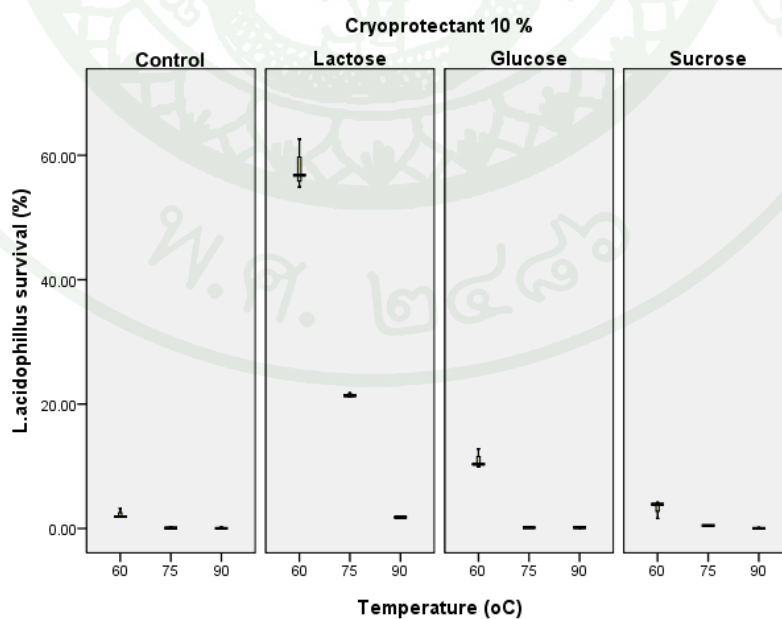
ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อน้ำหนักแห้งกับระยะเวลาในการทำแห้งแบบแช่

เยือกแข็งบางส่วนจุลินทรีย์ โดยมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 60, 75 และ 90

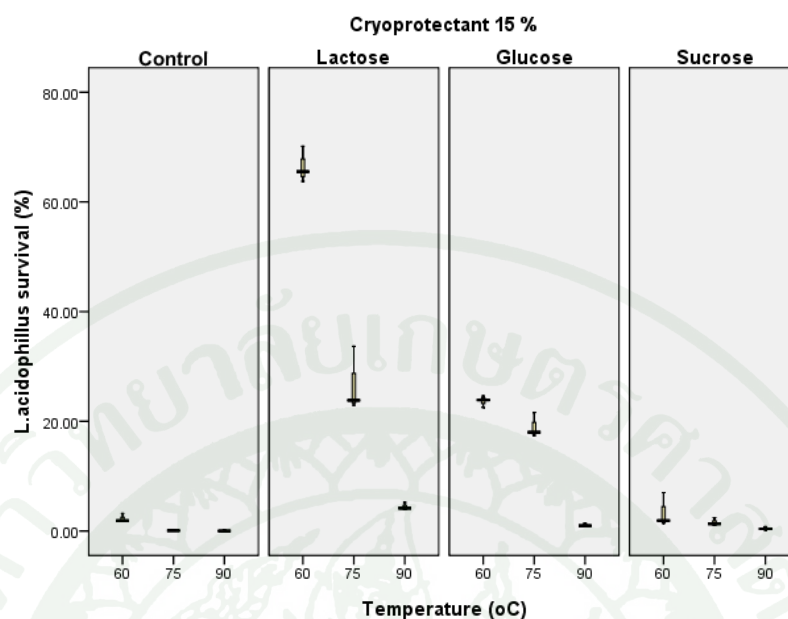
องศาเซลเซียส ความดันประมาณ 0-200 mbar



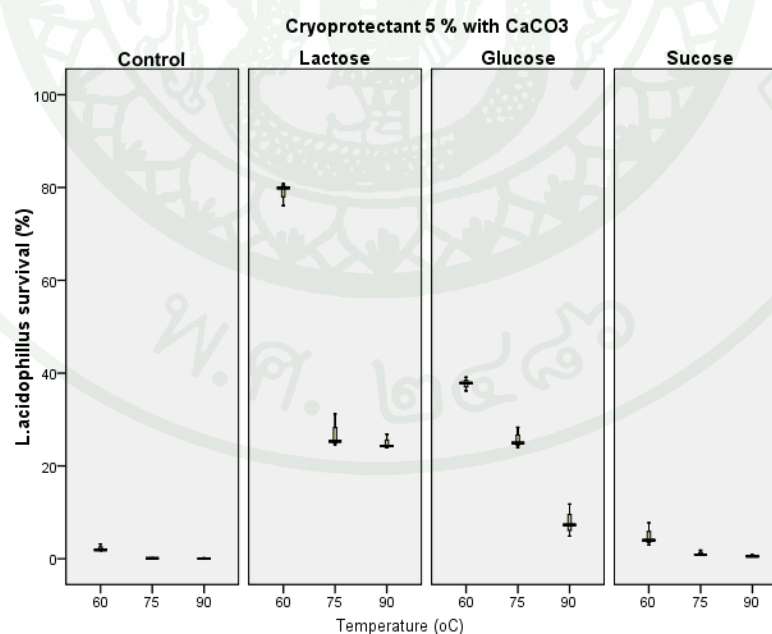
ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมนสารป้องกันความเย็น 5 %



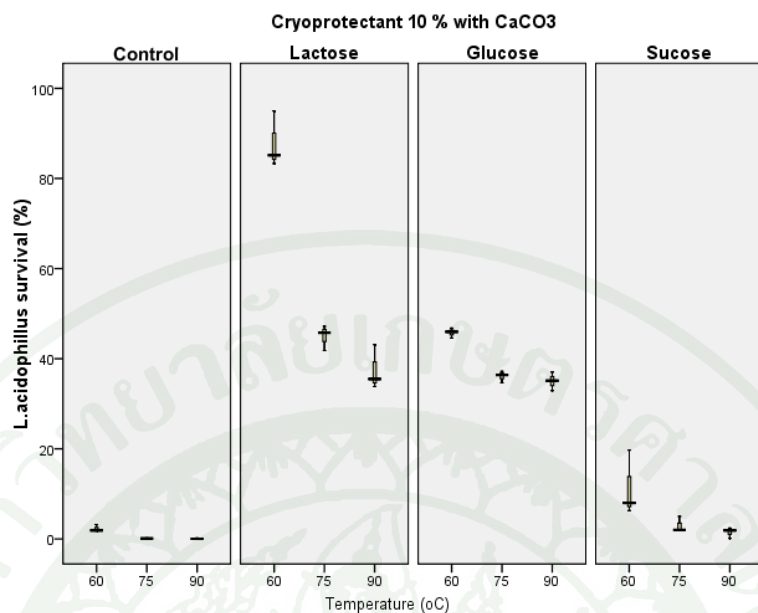
ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมนสารป้องกันความเย็น 10 %



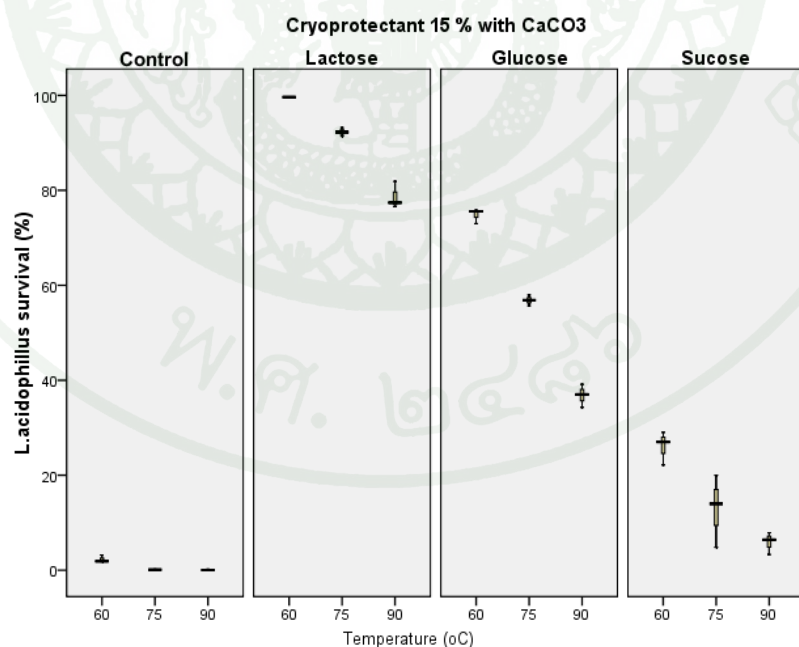
ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำป้องกันความเย็น 15 %



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำป้องกันความเย็น 5 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำป้องกันความเย็น 10 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำป้องกันความเย็น 15 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต

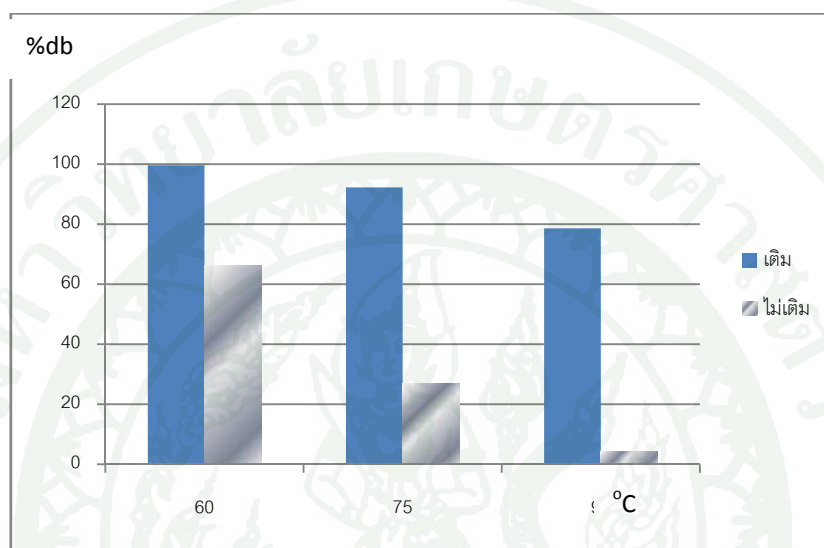
2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันความเย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

ในการทดลองนี้เลือกใช้สารป้องกันความเย็น 3 ชนิด คือ แลคโตส, กลูโคส และซูโครส เนื่องจากเป็นสารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลจำพวกเป็นกลาง จะออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่ภายนอกเซลล์ และใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ และเป็นพิษน้อยกว่าด้วย (กฤษณ์, 2536) จากภาพที่ 15-17 จะสังเกตได้ว่าที่อุณหภูมิเดียวกัน การรอดชีวิตของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารป้องกันความเย็นทั้ง 3 ชนิด และเมื่อพิจารณาเฉพาะที่ใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 องศาเซลเซียส และเติมสารป้องกันความเย็นที่ 15% ในภาพที่ 17 การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ลดลงตามชนิดของสารป้องกันความเย็น ดังนี้ แลคโตส 99.65% กลูโคส 74.8% และซูโครส 26.05% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Lactobacillus acidophilus* เป็นพวกที่ต้องการสารอาหารซับซ้อน ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปได้ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย Lactic มักมีส่วนประกอบของวิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ โดยแลคโตสที่เติมเข้าไปจะถูกใช้เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และช่วยรักษาสภาพความสมดุลของแรงดันออสโมติกได้ดี สำหรับกลูโคสนั้น เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กจึงแพร่เข้าออกเซลล์ได้ จึงมีนักวิจัยที่จัดน้ำตาลกลูโคสให้เป็นสารป้องกันความเย็นประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ด้วย ซึ่งอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (กฤษณ์, 2536) ส่วนซูโครสนิยมใช้เป็นตัวปรับ Osmotic pressure เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเกิด Osmotic shock ของจุลินทรีย์ (จำเนียร, 2534) ซึ่งการใช้ซูโครสจะมีประสิทธิภาพดีก็ต่อเมื่อมีการใช้ร่วมกับสารป้องกันความเย็นประเภทสารประกอบธรรมชาติ เช่น สคิมมิลค์ (สมบุรณ์, 2544)

3. ผลของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

จากการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเติมและไม่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่มีการใช้สารป้องกันความเย็นแลคโตส กลูโคส หรือซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอัตราส่วน 1:1 (v/w) แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 75 และ 90 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์สูงขึ้นกว่าการที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตในทุก

ระดับอุณหภูมิที่ให้ความร้อน ดังแสดงในภาพที่ 18 เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตละลายในน้ำได้น้อยลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จึงอาจก่อให้เกิดโครงสร้างในสารตัวอย่างที่ช่วยปกป้องจุลินทรีย์จากการถ่ายเทความร้อน หรือใช้เป็นที่พักบัง(shelter)ได้ จึงทำให้จุลินทรีย์เหลือรอดชีวิตได้มากขึ้น

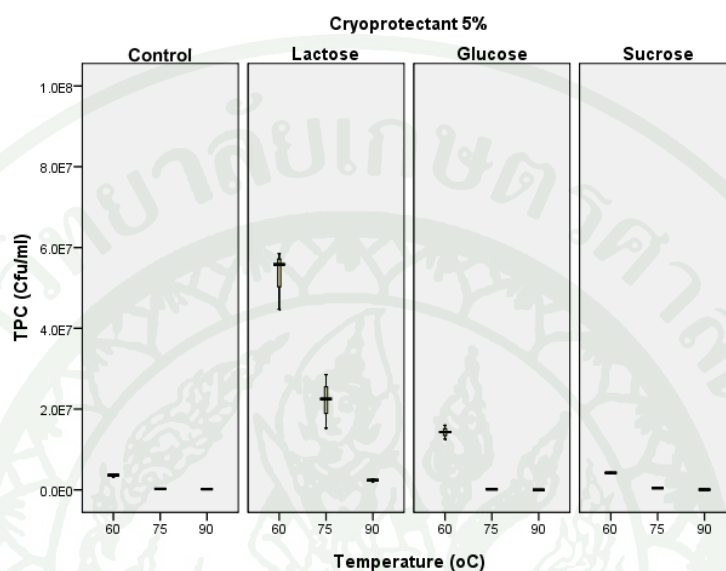


ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส และมีการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตรวมกับการใช้สารป้องกันความเย็นที่ 15% ของแลคโตส

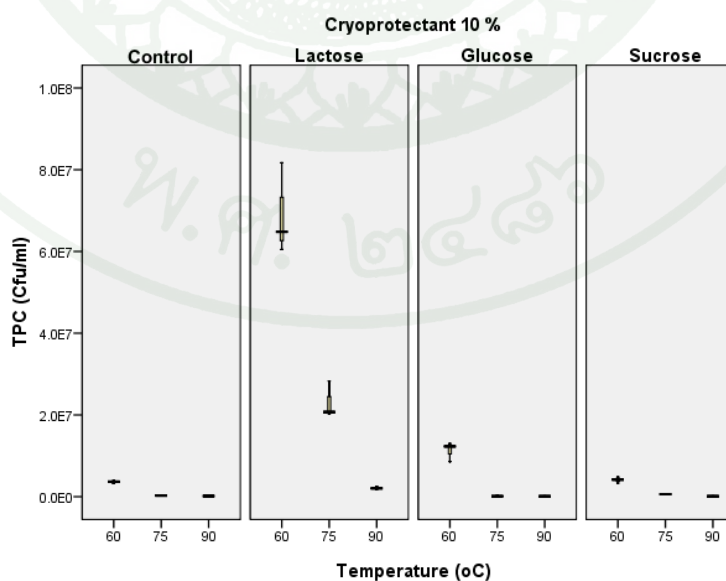
4. ผลการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนโดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar)

การทดลองนี้ทำการตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์ ควบคู่ไปกับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้ว่ามีแนวโน้มเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร จากภาพที่ 22-24 การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* เมื่อไม่มีการเติมสารป้องกันความเย็นและแคลเซียมคาร์บอเนต ทำการทดสอบโดยการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 1.58×10^5 - 3.60×10^6 CFU/ml จะสังเกตได้ว่าเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งเพิ่มขึ้นจะทำให้จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง แต่เมื่อมีการใช้สารป้องกันความเย็น 5-15 % ยังไม่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 4.80×10^5 - 7.90×10^7 CFU/ml และเมื่อมีการใช้

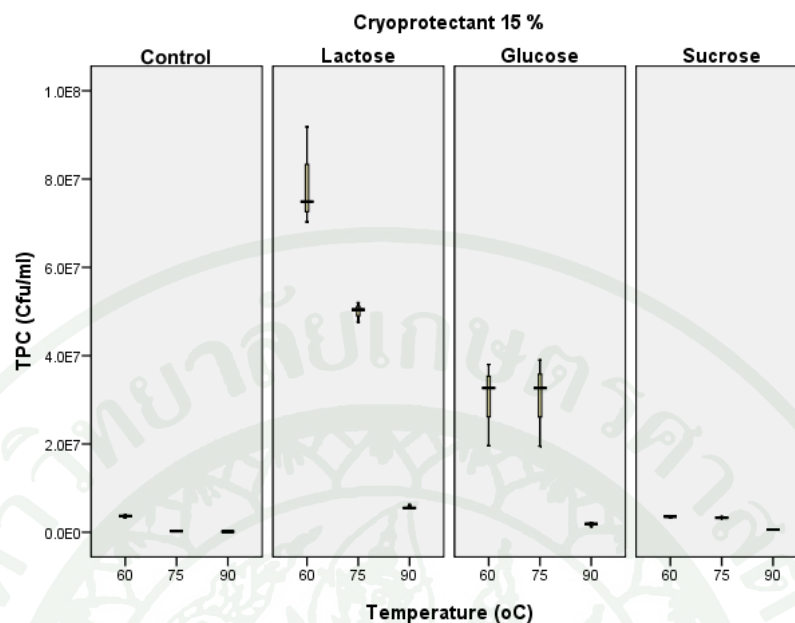
สารป้องกันความเย็น 5-15 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต ดังภาพที่ 25-27 พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 7.90×10^5 - 1.43×10^8 CFU/ml จะเห็นได้ว่าการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบโดยการตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์



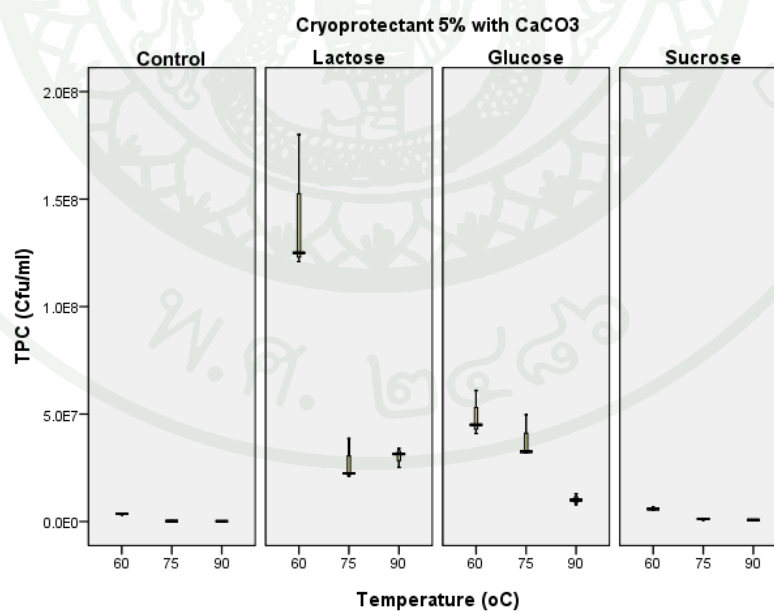
ภาพที่ 22 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำป้องกันความเย็น 5 %



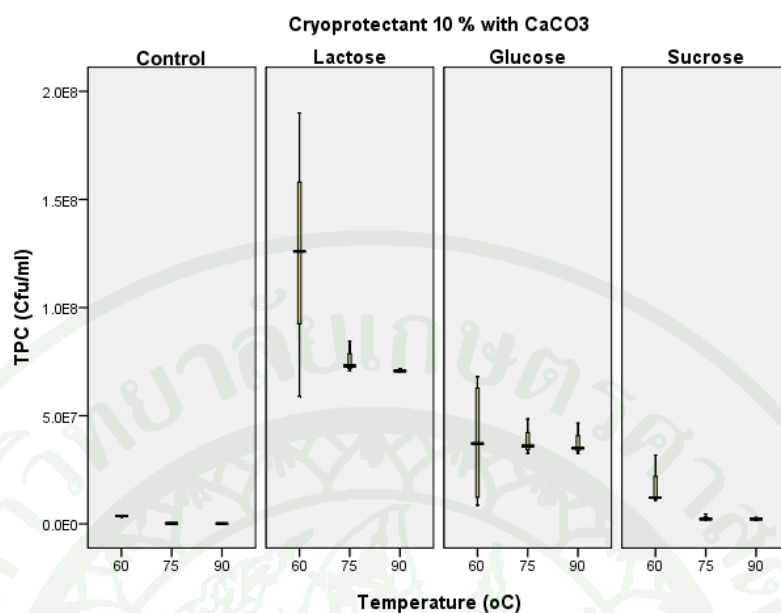
ภาพที่ 23 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำป้องกันความเย็น 10 %



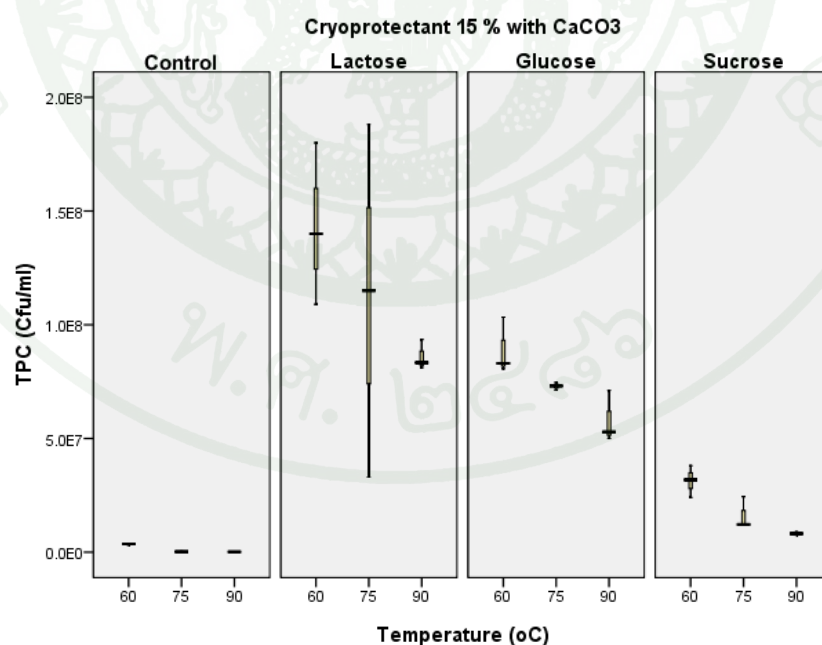
ภาพที่ 24 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำตาลป้องกันความเย็น 15 %



ภาพที่ 25 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมน้ำตาลป้องกันความเย็น 5 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 26 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมนสารป้องกันความเย็น 10 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต



ภาพที่ 27 จำนวนการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่ 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เติมนสารป้องกันความเย็น 15 % ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนต

5. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับค่าการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเฉพาะค่าการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนด้วยการตรวจสอบค่า Activity ของจุลินทรีย์ เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ทางสถิติพบว่า อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติมสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 6 ซึ่งแสดงผลทางสถิติสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน จะเห็นได้ว่าค่านัยสำคัญ (significant) สำหรับปัจจัยของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติมสารป้องกันความเย็น และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติมสารป้องกันความเย็น และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตอย่างน้อย 2 ระดับที่ทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนมีค่าแตกต่างกัน นอกจากนี้มีปัจจัยร่วม 2, 3 และ 4 ปัจจัย ที่มีค่านัยสำคัญน้อยกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่ามีผลกระทบร่วมของปัจจัยดังนี้ 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็น ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็น ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปัจจัยร่วมระหว่างชนิดกับปริมาณของสารป้องกันความเย็น ปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปัจจัยร่วมระหว่างปริมาณของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปัจจัยร่วม 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปัจจัยร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต และปัจจัยร่วม 4 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติมสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต การมีอิทธิพลของปัจจัยร่วมตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไป ส่งผลให้ตัวแปรตามมีค่าแปรผันไป การอยู่ร่วมกันของปัจจัยอาจมีอิทธิพลต่อความผันแปรของข้อมูลเช่นเดียวกับปัจจัยตัวใดตัวหนึ่ง

ตารางที่ 6 ผลทางสถิติ (ANOVA) ของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของการเติมสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

Source	Type III Sum of				
	Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	131192.640	56	2342.726	326.347	.000
Intercept	66702.340	1	66702.340	9.292E3	.000
Temperature	11661.317	2	5830.659	812.224	.000
Cryoprotectant	46324.521	2	23162.261	3.227E3	.000
Percent	9778.329	2	4889.164	681.072	.000
CaCo3	24587.024	1	24587.024	3.425E3	.000
Temperature * Cryoprotectant	9047.760	4	2261.940	315.093	.000
Temperature * Percent	405.460	4	101.365	14.120	.000
Temperature * CaCo3	49.444	2	24.722	3.444	.035
Cryoprotectant * Percent	2132.381	4	533.095	74.261	.000
Cryoprotectant * CaCo3	7028.300	2	3514.150	489.529	.000
Percent * CaCo3	3914.205	2	1957.102	272.629	.000
Temperature * Cryoprotectant * Percent	1101.788	8	137.723	19.185	.000
Temperature * Cryoprotectant * CaCo3	990.237	4	247.559	34.486	.000
Temperature * Percent * CaCo3	176.107	4	44.027	6.133	.000
Cryoprotectant * Percent * CaCo3	1073.718	4	268.430	37.393	.000
Temperature * Cryoprotectant * Percent * CaCo3	1399.855	8	174.982	24.375	.000
Error	818.364	114	7.179		
Total	224980.383	171			
Corrected Total	132011.004	170			

จากตารางที่ 6 วิเคราะห์ความแปรปรวน ปัจจัยที่แตกต่างกันมีผลให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 จึงดำเนินการเปรียบเทียบพหุคูณเพื่อให้ทราบว่าปัจจัยใดบ้างที่มีผลให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8, 11, 14 และ 17

ตารางที่ 7 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง

Temperature	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
60	36.911	.355	36.208	37.614
75	20.475	.355	19.772	21.178
90	12.565	.355	11.862	13.268

จากตารางที่ 7 แสดงตัวแปรอุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับอุณหภูมิได้มาจากการไม่เติมและเติมสารป้องกันความเย็น จากทุกเปอร์เซ็นต์ของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ รวมถึงการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ภายหลังการทำแห้งสูงกว่า อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 75 และ 90 °C คือที่อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด 36.91% ที่ 75 °C รองลงมาเหลือ 20.48 % และ 90 °C น้อยที่สุด 12.56 %

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของอุณหภูมิในช่วงทำแห้งสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

(I)	(J)	Mean		95% Confidence Interval for Difference		
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
Temperature 60	Temperature 75	16.436	.502	.000	15.442	17.431
	90	24.347	.502	.000	23.353	25.341
75	60	-16.436	.502	.000	-17.431	-15.442
	90	7.910	.502	.000	6.916	8.905
90	60	-24.347	.502	.000	-25.341	-23.353
	75	-7.910	.502	.000	-8.905	-6.916

จากตารางที่ 8 จากผลการเปรียบเทียบพหุคูณพบว่าอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C มีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C 24.35 % และอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C มีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C 24.35 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ของอุณหภูมิในช่วงทำแห้งสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

Temperature	N	Subset		
		1	2	3
90	57	12.5646		
75	57		20.4749	
60	57			36.9114
Sig.		1.000	1.000	1.000

จากตารางที่ 9 ผลปรากฏว่าอุณหภูมิในช่วงทำแห้งที่แตกต่างกันทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิคือ 60, 75 และ 90 °C ให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ($p < 0.05$)

ตารางที่ 10 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรชนิดของสารป้องกันความเย็น

Cryoprotectant	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Control	.834	.893	-.935	2.604
Lactose	45.814	.365	45.092	46.537
Glucose	23.445	.365	22.723	24.167
Sucrose	4.439	.365	3.716	5.161

จากตารางที่ 10 แสดงตัวแปรชนิดของสารป้องกันความเย็นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของสารป้องกันความเย็นได้มาจาก 3 ระดับอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง จากทุกเปอร์เซ็นต์ของสารป้องกันความเย็นที่ใช้รวมถึงการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าการเติมแลคโตสเป็นสารป้องกันความเย็น จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังจากการทำแห้งสูงกว่าการไม่เติมสารป้องกันความเย็น และการเติมกลูโคสหรือซูโครส การเติมแลคโตสมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุดคือ 45.81% กลูโคสรองลงมา 23.45 % ซูโครส 4.44 % และการไม่เติมสารป้องกันความเย็นน้อยที่สุดคือ 0.83 %

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของสารป้องกันความเย็นแต่ละชนิดสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval for Difference	
					Lower Bound	Upper Bound
Cryoprotectant Control	Cryoprotectant Lactose	-44.980	.965	.000	-46.891	-43.069
	Glucose	-22.610	.965	.000	-24.521	-20.699
	Sucrose	-3.604	.965	.000	-5.515	-1.693
Lactose	Control	44.980	.965	.000	43.069	46.891
	Glucose	22.370	.516	.000	21.348	23.391
	Sucrose	41.376	.516	.000	40.354	42.397
Glucose	Control	22.610	.965	.000	20.699	24.521
	Lactose	-22.370	.516	.000	-23.391	-21.348
	Sucrose	19.006	.516	.000	17.985	20.028
Sucrose	Control	3.604	.965	.000	1.693	5.515
	Lactose	-41.376	.516	.000	-42.397	-40.354
	Glucose	-19.006	.516	.000	-20.028	-17.985

จากตารางที่ 11 จากผลการเปรียบเทียบพหุคูณพบว่าไม่เติมสารป้องกันความเย็นมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าการเติมแลคโตส 44.98 % และการเติมแลคโตส มีค่า

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าการไม่เติมสารป้องกันความเย็น 44.98 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ของสารป้องกันความเย็นสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

Cryoprotectant	N	Subset			
		1	2	3	4
Control	9	.8344			
Sucrose	54		4.4387		
Glucose	54			23.4448	
Lactose	54				45.8144
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

จากตารางที่ 12 ผลปรากฏว่าสารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดคือ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมแลคโตส กลูโคสและซูโครส ให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรปริมาณของสารป้องกันความเย็น

Percent	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	.834	.893	-.935	2.604
5	16.473	.365	15.750	17.195
10	22.177	.365	21.455	22.900
15	35.048	.365	34.326	35.770

จากตารางที่ 13 แสดงตัวแปรปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปริมาณสารป้องกันความเย็นได้มาจาก 3 ระดับอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง จากทุกชนิดของสารป้องกันความเย็นที่ใช้รวมถึงการเติมและไม่เติมแลคโตสเชื่อมคาร์บอนต พบว่าการเติมสารป้องกันความเย็น 15 % จะมีการรอด

ชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งสูงกว่าการไม่เติมสารป้องกันความชื้น และการเติมสารป้องกันความชื้น 5 % หรือ 10 % การเติมสารป้องกันความชื้น 15 % มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุดคือ 35.02% การเติม 10 % รองลงมาคือ 22.18 % การเติม 5 % คือ 16.47 % และการไม่เติมสารป้องกันความชื้นน้อยที่สุดคือ 0.83 %

ตารางที่ 14 ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของปริมาณการเติมสารป้องกันความชื้นสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval for Difference	
					Lower Bound	Upper Bound
0	5	-15.638	.965	.000	-17.549	-13.727
	10	-21.343	.965	.000	-23.254	-19.432
	15	-34.214	.965	.000	-36.124	-32.303
5	0	15.638	.965	.000	13.727	17.549
	10	-5.705	.516	.000	-6.726	-4.683
	15	-18.575	.516	.000	-19.597	-17.554
10	0	21.343	.965	.000	19.432	23.254
	5	5.705	.516	.000	4.683	6.726
	15	-12.871	.516	.000	-13.892	-11.849
15	0	34.214	.965	.000	32.303	36.124
	5	18.575	.516	.000	17.554	19.597
	10	12.871	.516	.000	11.849	13.892

จากตารางที่ 14 จากผลการเปรียบเทียบพหุคูณพบว่า การไม่เติมสารป้องกันความชื้นมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าการเติมสารป้องกันความชื้น 15 % อยู่ 34.21 % และการเติมสารป้องกันความชื้น 15 % มีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าการไม่เติมสารป้องกันความชื้น 34.21 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ของสารป้องกันความเย็นสำหรับการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

Percent	N	Subset			
		1	2	3	4
0	9	.8344			
5	54		16.4726		
10	54			22.1774	
15	54				35.0480
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

จากตารางที่ 15 ผลปรากฏว่าปริมาณสารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกันทั้ง 4 ระดับอุณหภูมิ คือ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10 และ 15 % ให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ($p < 0.05$)

ตารางที่ 16 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

CaCo3	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
No	11.105	.282	10.546	11.665
Add	36.886	.298	36.296	37.475

จากตารางที่ 16 แสดงตัวแปรการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตได้มาจาก 3 ระดับอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง จากทุกชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งสูงกว่าการไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ 36.89% การไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 11.11 %

ตารางที่ 17 ผลการเปรียบเทียบพหุคูณ ของการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตสำหรับการรอดชีวิตของ เชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน

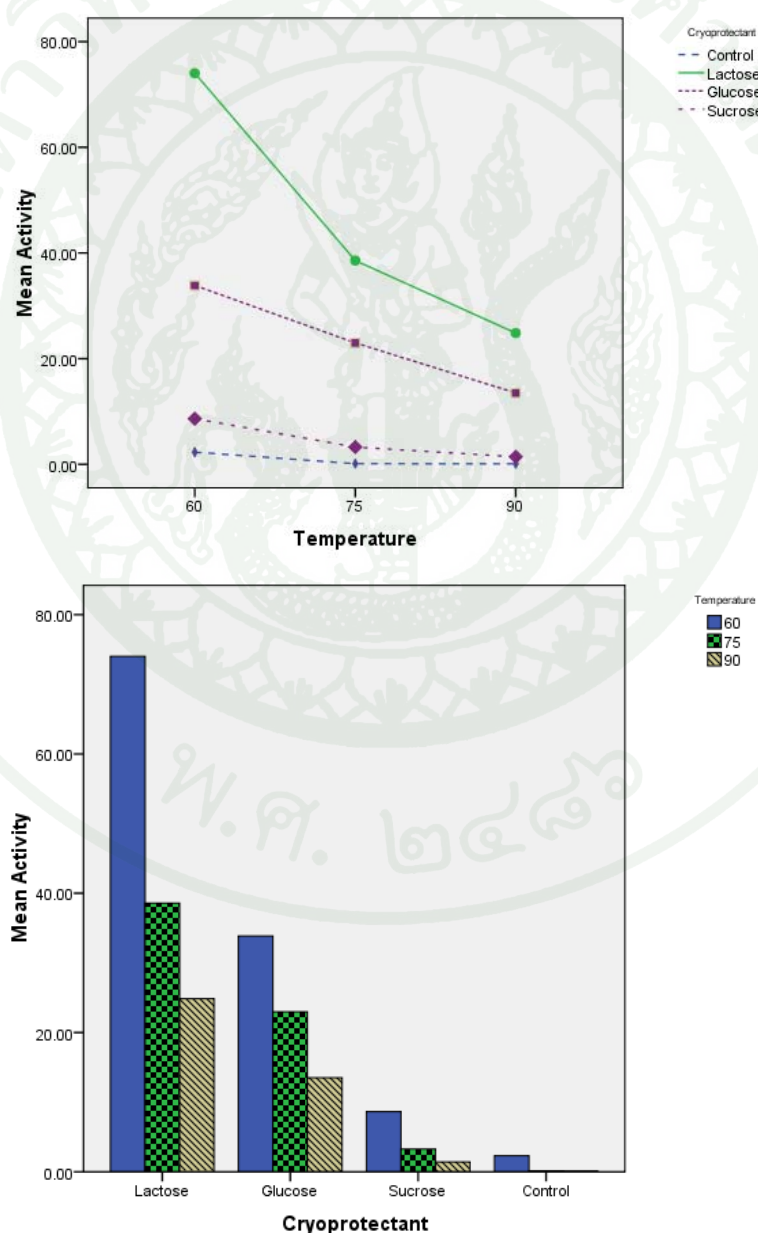
(I)	(J)	Mean	95% Confidence Interval for Difference			
CaCo3	CaCo3	Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
No	Add	-25.780	.410	.000	-26.593	-24.967
Add	No	25.780	.410	.000	24.967	26.593

จากตารางที่ 17 จากผลการเปรียบเทียบพหุคูณพบว่า การไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 25.78 % และการเติมสารแคลเซียมคาร์บอเนต มีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าการไม่เติมสารป้องกันความเย็น 25.78 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

ตารางที่ 18 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็น

Temperature	Cryoprotectant	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
60	Control	2.300	1.547	-.764	5.364
	Lactose	74.027	.632	72.776	75.278
	Glucose	33.846	.632	32.595	35.097
	Sucrose	8.630	.632	7.379	9.881
75	Control	.117	1.547	-2.948	3.181
	Lactose	38.571	.632	37.320	39.822
	Glucose	22.982	.632	21.731	24.233
	Sucrose	3.264	.632	2.013	4.515
90	Control	.087	1.547	-2.978	3.151
	Lactose	24.846	.632	23.595	26.097
	Glucose	13.506	.632	12.255	14.757
	Sucrose	1.422	.632	.171	2.673

จากตารางที่ 18 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับแลคโตสจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 74.03 % การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยไม่มีการเติมสารป้องกันความเย็นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.09%



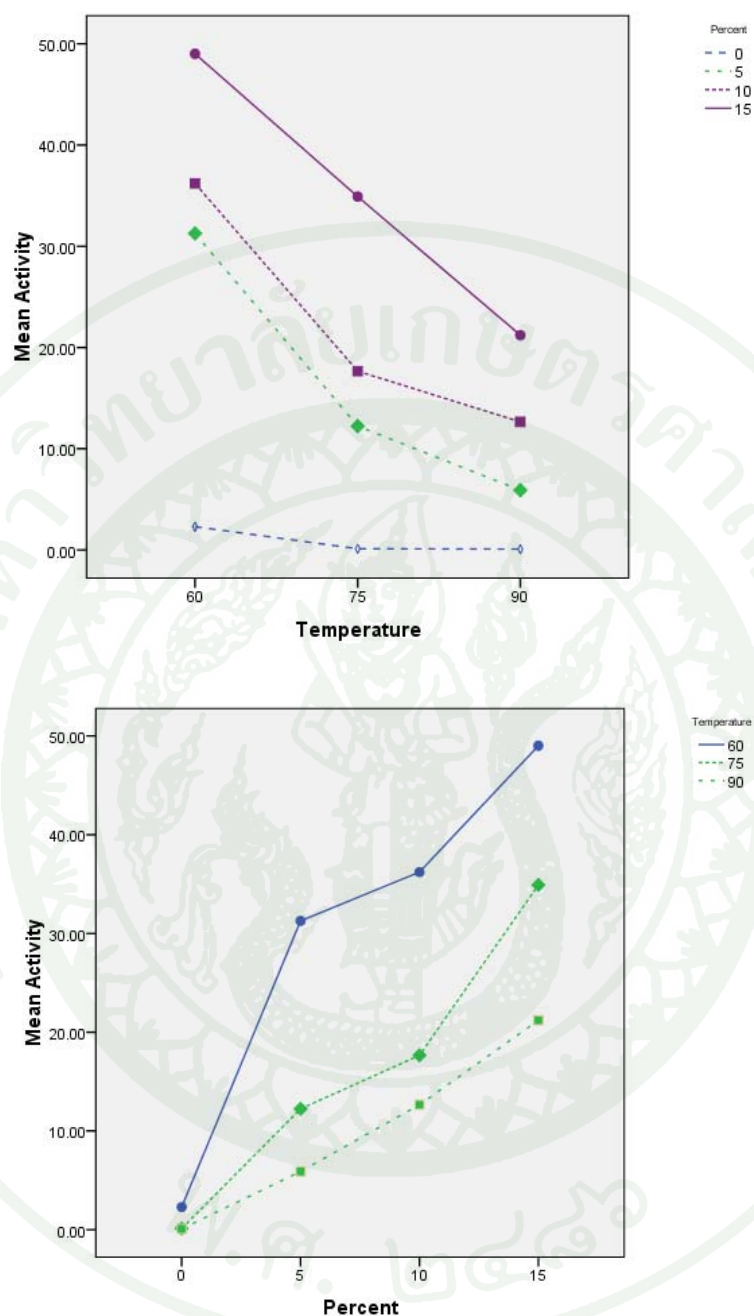
ภาพที่ 28 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็น

จากภาพที่ 28 การใช้สารป้องกันความเย็นทุกชนิดจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งสูงขึ้น ทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้งจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงตามลำดับการใช้สารป้องกันความเย็นดังนี้ แลคโตส กลูโคส ซูโครส และการไม่เติมสารป้องกันความเย็น

ตารางที่ 19 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็น

Temperature	Percent	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
60	0	2.300	1.547	-.764	5.364
	5	31.274	.632	30.023	32.525
	10	36.214	.632	34.963	37.465
	15	49.014	.632	47.763	50.265
75	0	.117	1.547	-2.948	3.181
	5	12.241	.632	10.990	13.492
	10	17.665	.632	16.414	18.916
	15	34.912	.632	33.661	36.163
90	0	.087	1.547	-2.978	3.151
	5	5.903	.632	4.652	7.154
	10	12.653	.632	11.402	13.904
	15	21.217	.632	19.966	22.468

จากตารางที่ 19 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกชนิดของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับการเติมสารป้องกันความเย็น 15 % จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 49.01 % การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยไม่มีการเติมสารป้องกันความเย็นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.09%



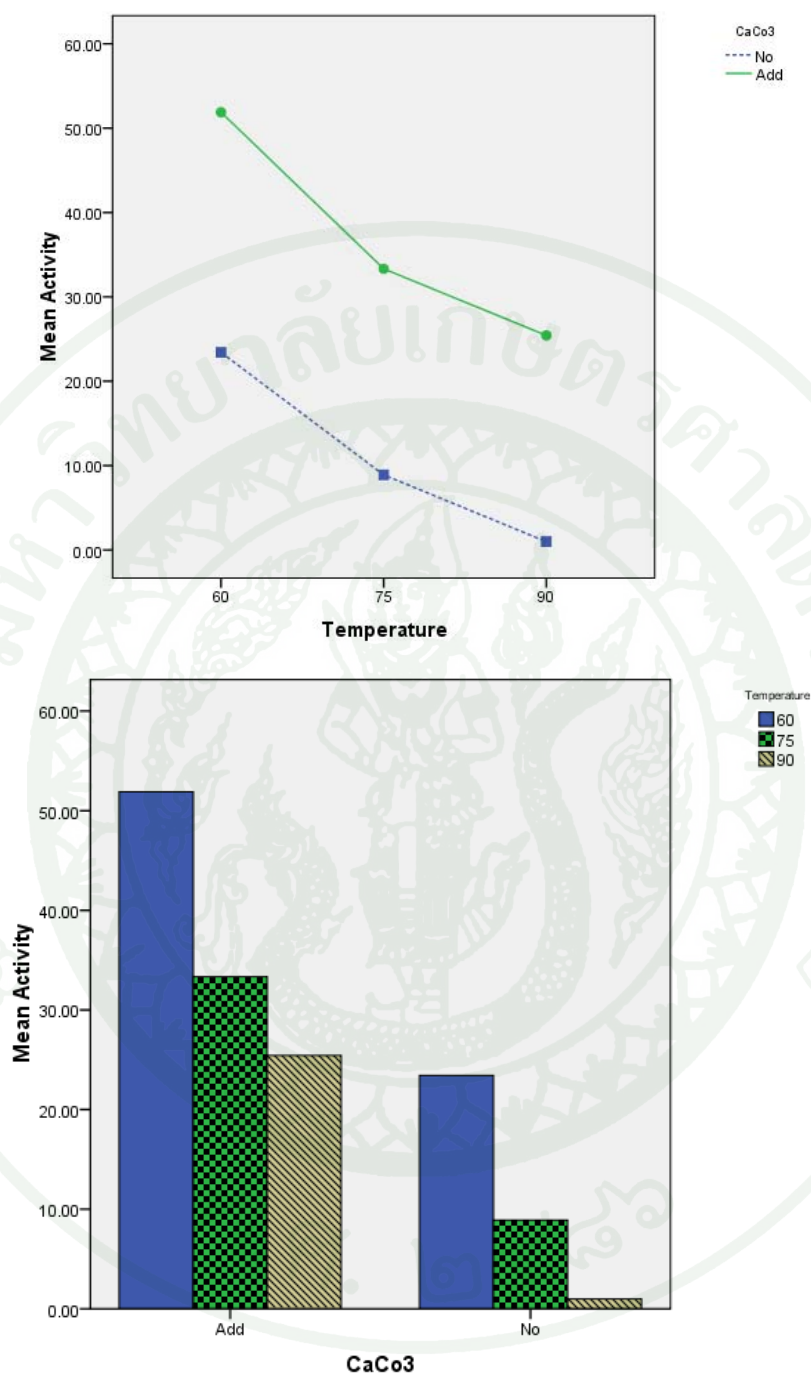
ภาพที่ 29 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความเย็น

จากภาพที่ 29 ทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งสูงขึ้น ทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้งจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณของสารป้องกันความเย็นดังนี้ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10 และ 15 %

ตารางที่ 20 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

Temperature	CaCo3	95% Confidence Interval			
		Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
60	No	23.429	.489	22.460	24.398
	Add	51.891	.516	50.870	52.913
75	No	8.902	.489	7.933	9.871
	Add	33.334	.516	32.312	34.355
90	No	.984	.489	.015	1.953
	Add	25.431	.516	24.410	26.453

จากตารางที่ 20 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่ใช้ การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 15 % จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 51.89 % การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยไม่มีการเติมสารป้องกันความเย็นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.98%



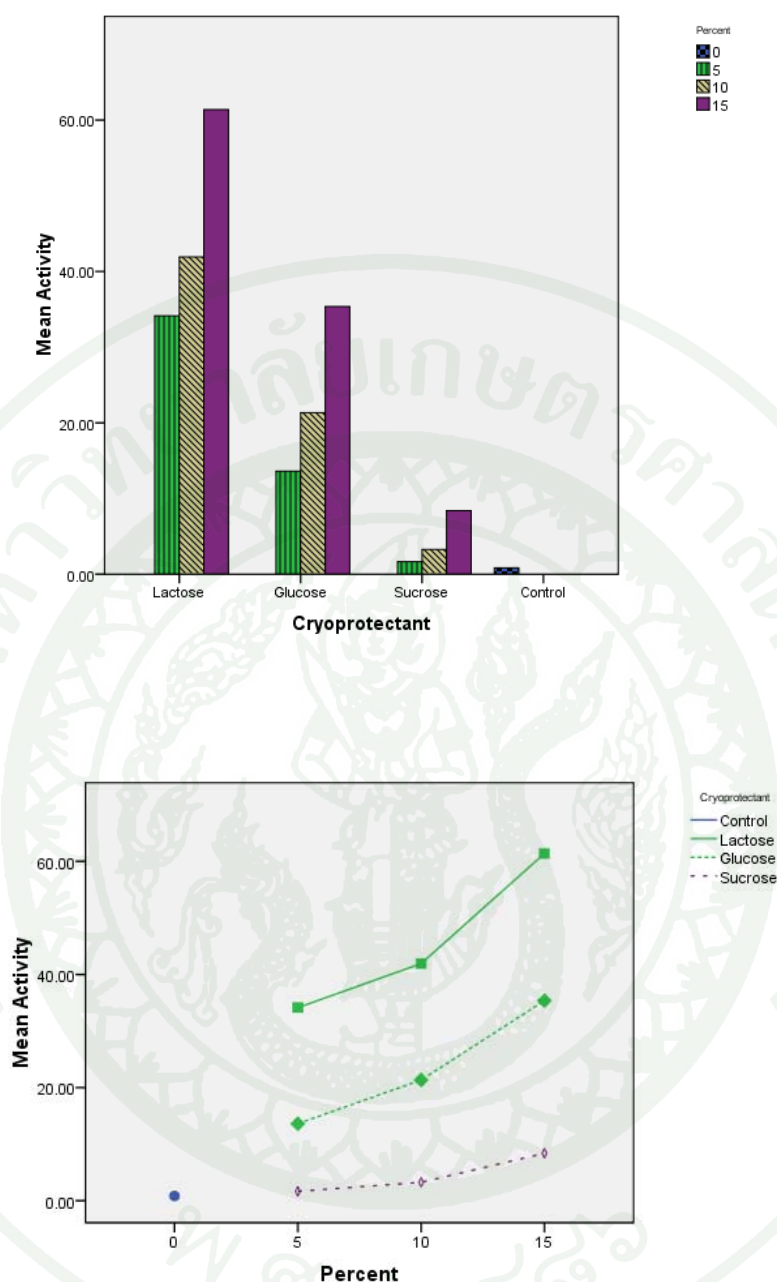
ภาพที่ 30 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากภาพที่ 30 การเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งสูงขึ้น ทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้งจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นถ้าเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ตารางที่ 21 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น

		95% Confidence Interval			
Cryoprotectant	Percent	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Control	0	.834	.893	-.935	2.604
Lactose	5	34.142	.632	32.891	35.393
	10	41.922	.632	40.671	43.173
	15	61.379	.632	60.128	62.630
Glucose	5	13.613	.632	12.362	14.864
	10	21.350	.632	20.099	22.601
	15	35.372	.632	34.121	36.623
Sucrose	5	1.663	.632	.412	2.914
	10	3.260	.632	2.009	4.511
	15	8.393	.632	7.142	9.644

จากตารางที่ 21 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การใช้แอลกอฮอล์ 15 % จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 61.38 % ส่วนการไม่เติมสารป้องกันความเย็นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.83%



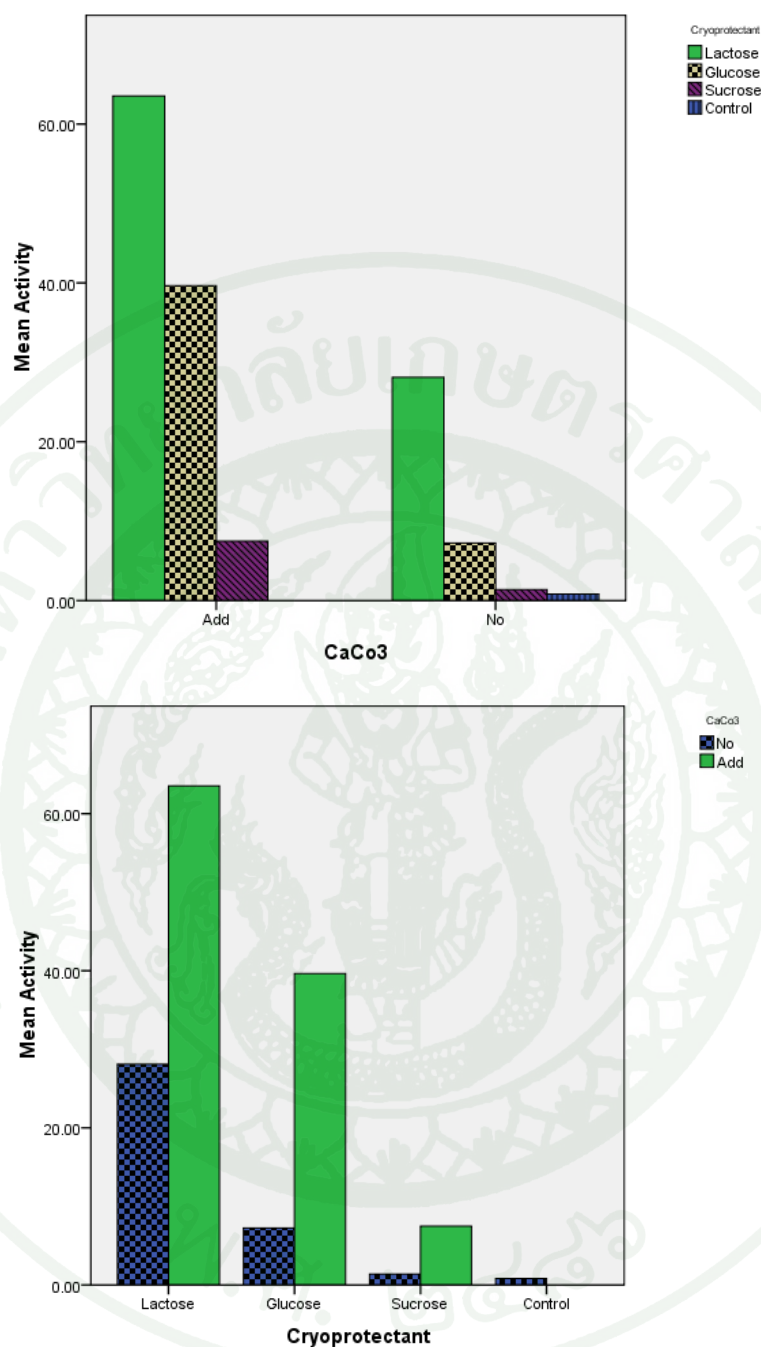
ภาพที่ 31 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น

จากภาพที่ 31 ทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงตามลำดับการใช้สารป้องกันความเย็นดังนี้ แลคโตส กลูโคส ซูโครส และการไม่เติมสารป้องกันความเย็น ทุกชนิดของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณการเติมสารป้องกันความเย็นดังนี้ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10, และ 15 %

ตารางที่ 22 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างชนิดของสารป้องกันความเย็น และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

Cryoprotectant	CaCo3	95% Confidence Interval			
		Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Control	No	.834	.893	-.935	2.604
Lactose	No	28.100	.516	27.079	29.122
	Add	63.529	.516	62.507	64.550
Glucose	No	7.246	.516	6.224	8.267
	Add	39.644	.516	38.622	40.665
Sucrose	No	1.393	.516	.372	2.414
	Add	7.484	.516	6.463	8.506

จากตารางที่ 22 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง และทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็น การใช้แลคโตสรวมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 63.53 % การไม่เติมสารป้องกันความเย็นและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.83%



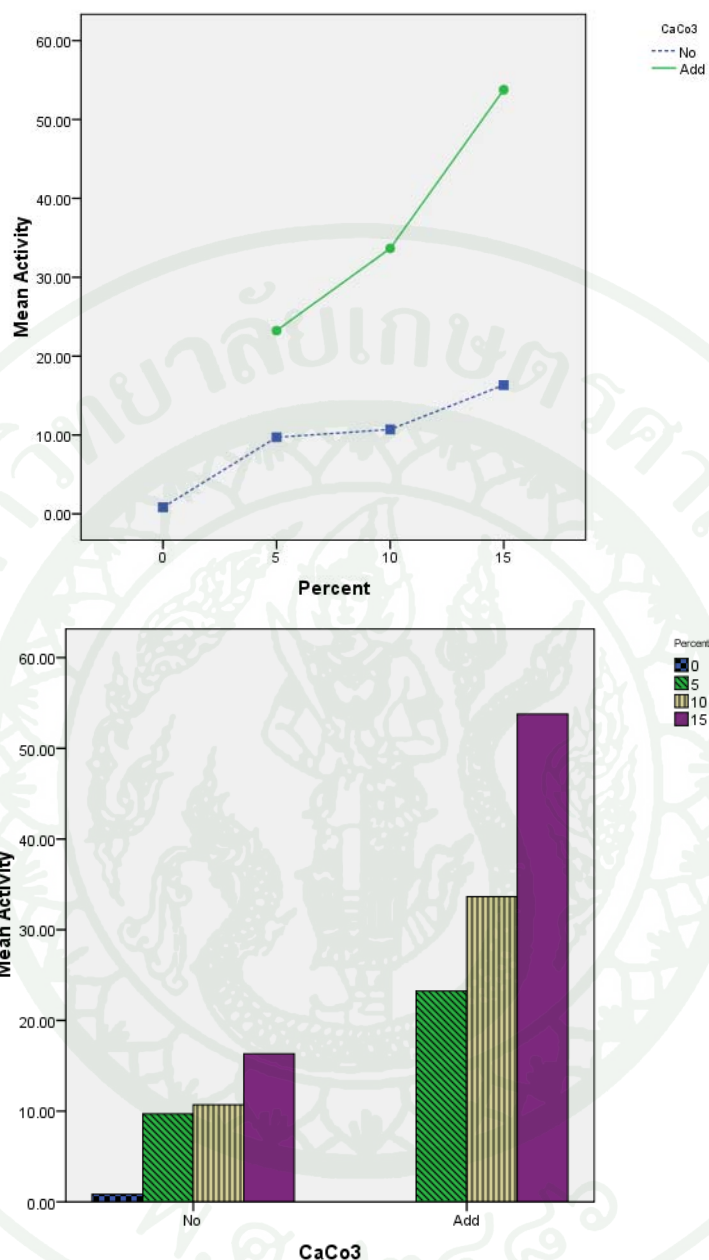
ภาพที่ 32 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากภาพที่ 32 ทุกชนิดของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนต การเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงตามลำดับชนิดของสารป้องกันความเย็นดังนี้ แลคโตส กลูโคส ซูโครส และการไม่เติมสารป้องกันความเย็น

ตารางที่ 23 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

95% Confidence Interval					
Percent	CaCo3	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
0	No	.834	.893	-.935	2.604
5	No	9.707	.516	8.685	10.728
	Add	23.239	.516	22.217	24.260
10	No	10.702	.516	9.680	11.723
	Add	33.653	.516	32.632	34.674
15	No	16.331	.516	15.309	17.352
	Add	53.765	.516	52.744	54.787

จากตารางที่ 23 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง และทุกชนิดของสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 15 % ร่วมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 53.77 % การไม่เติมสารป้องกันความเย็นและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.83%



ภาพที่ 33 การมีปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรร่วมระหว่างปริมาณของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

จากภาพที่ 33 การเติมและไม่เติมเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณการเติมสารป้องกันความเย็นดังนี้ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10, และ 15 % ทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ตารางที่ 24 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็น

Temperature	Cryoprotectant	Percent	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
60	Control	0	2.300	1.547	-.764	5.364
		5	66.060	1.094	63.893	68.227
		10	72.962	1.094	70.795	75.129
		15	83.058	1.094	80.891	85.225
	Glucose	5	23.903	1.094	21.736	26.070
		10	28.395	1.094	26.228	30.562
		15	49.240	1.094	47.073	51.407
	Sucrose	5	3.860	1.094	1.693	6.027
		10	7.285	1.094	5.118	9.452
		15	14.745	1.094	12.578	16.912
	Control	0	.117	1.547	-2.948	3.181
		5	22.990	1.094	20.823	25.157
		10	33.170	1.094	31.003	35.337
		15	59.553	1.094	57.386	61.720
	Glucose	5	12.927	1.094	10.760	15.094
		10	18.100	1.094	15.933	20.267
		15	37.920	1.094	35.753	40.087
	Sucrose	5	.805	1.094	-1.362	2.972
		10	1.725	1.094	-.442	3.892
		15	7.263	1.094	5.096	9.430

ตารางที่ 24 (ต่อ)

Temperature	Cryoprotectant	Percent	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
90	Control	0	.087	1.547	-2.978	3.151
	Lactose	5	13.375	1.094	11.208	15.542
		10	19.635	1.094	17.468	21.802
		15	41.527	1.094	39.360	43.694
	Glucose	5	4.008	1.094	1.841	6.175
		10	17.555	1.094	15.388	19.722
		15	18.955	1.094	16.788	21.122
	Sucrose	5	.325	1.094	-1.842	2.492
		10	.770	1.094	-1.397	2.937
		15	3.170	1.094	1.003	5.337

จากตารางที่ 24 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน ซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากการเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับการเติมแลคโตส 15 % จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 83.06 % การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยที่ไม่เติมสารป้องกันความเย็นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.87%

ตารางที่ 25 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

95% Confidence Interval							
Temperature	Cryoprotectant	CaCo3	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	
60	Control	No	2.300	1.547	-.764	5.364	
		Lactose	No	59.251	.893	57.482	61.020
		Add	88.802	.893	87.033	90.571	
	Glucose	No	14.923	.893	13.154	16.693	
		Add	52.769	.893	51.000	54.538	
	Sucrose	No	3.157	.893	1.387	4.926	
		Add	14.103	.893	12.334	15.873	
	75	Control	No	.117	1.547	-2.948	3.181
		Lactose	No	22.394	.893	20.625	24.164
			Add	54.748	.893	52.979	56.517
		Glucose	No	6.408	.893	4.639	8.177
Add			39.557	.893	37.787	41.326	
Sucrose		No	.832	.893	-.937	2.601	
		Add	5.697	.893	3.927	7.466	
90	Control	No	.087	1.547	-2.978	3.151	
	Lactose	No	2.656	.893	.886	4.425	
		Add	47.036	.893	45.266	48.805	
	Glucose	No	.407	.893	-1.363	2.176	
		Add	26.606	.893	24.836	28.375	
	Sucrose	No	.190	.893	-1.579	1.959	
		Add	2.653	.893	.884	4.423	

จากตารางที่ 25 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับชนิดของสารป้องกันความเย็นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็น การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับการเติมแคลโคไลต์และแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของ

เชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 88.80 % การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยที่ไม่เติมสารป้องกันความชื้นและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.87%

ตารางที่ 26 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความชื้นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

95% Confidence Interval						
Temperature	Percent	CaCo3	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
60	0	No	2.300	1.547	-.764	5.364
	5	No	22.026	.893	20.256	23.795
		Add	40.523	.893	38.754	42.293
	10	No	24.112	.893	22.343	25.881
		Add	48.316	.893	46.546	50.085
	75	15	No	31.193	.893	29.424
		Add	66.836	.893	65.066	68.605
		0	No	.117	1.547	-2.948
5		No	6.497	.893	4.727	8.266
		Add	17.984	.893	16.215	19.754
10		No	7.336	.893	5.566	9.105
	Add	27.994	.893	26.225	29.764	
15	No	15.802	.893	14.033	17.571	
	Add	54.022	.893	52.253	55.791	

ตารางที่ 26 (ต่อ)

Temperature	Percent	CaCo ₃	95% Confidence Interval			
			Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
90	0	No	.087	1.547	-2.978	3.151
	5	No	.598	.893	-1.171	2.367
		Add	11.208	.893	9.439	12.977
	10	No	.658	.893	-1.111	2.427
		Add	24.649	.893	22.880	26.418
	15	No	1.997	.893	.227	3.766
		Add	40.438	.893	38.669	42.207

จากตารางที่ 26 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้งกับปริมาณของสารป้องกันความชื้นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกชนิดของสารป้องกันความชื้น การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับการเติมสารป้องกันความชื้น 15 % และแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 66.84 % การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยที่ไม่เติมสารป้องกันความชื้นและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.87%

ตารางที่ 27 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

			95% Confidence Interval			
Cryoprotectant	Percent	CaCo3	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Control	0	No	.834	.893	-.935	2.604
Lactose	5	No	24.622	.893	22.853	26.391
		Add	43.661	.893	41.892	45.430
	10	No	27.109	.893	25.340	28.878
		Add	56.736	.893	54.966	58.505
Glucose	15	No	32.570	.893	30.801	34.339
		Add	90.189	.893	88.420	91.958
	5	No	3.404	.893	1.635	5.174
		Add	23.821	.893	22.052	25.590
	10	No	3.743	.893	1.974	5.513
		Add	38.957	.893	37.187	40.726
Sucrose	15	No	14.590	.893	12.821	16.359
		Add	56.153	.893	54.384	57.923
	5	No	1.093	.893	-.676	2.863
		Add	2.233	.893	.464	4.003
	10	No	1.253	.893	-.516	3.023
		Add	5.267	.893	3.497	7.036
	15	No	1.832	.893	.063	3.601
		Add	14.953	.893	13.184	16.723

จากตารางที่ 27 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนซึ่งค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับได้มาจากทุกระดับของอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง การใช้แลคโตส 15 %

ร่วมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 90.18 % การไม่เติมสารป้องกันความชื้นและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.83%

ตารางที่ 28 ค่าสถิติพื้นฐานของแต่ละระดับในตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของสารป้องกันความชื้นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

Temperature	Cryoprotectant	Percent	CaCo3	Mean	Std.	95% Confidence Interval	
					Error	Lower Bound	Upper Bound
60	Control	0	No	2.300	1.547	-.764	5.364
	Lactose	5	No	53.187	1.547	50.122	56.251
			Add	78.933	1.547	75.869	81.998
	10	No	No	58.107	1.547	55.042	61.171
			Add	87.817	1.547	84.752	90.881
	15	No	No	66.460	1.547	63.396	69.524
			Add	99.657	1.547	96.592	102.721
	Glucose	5	No	10.090	1.547	7.026	13.154
			Add	37.717	1.547	34.652	40.781
		10	No	11.000	1.547	7.936	14.064
			Add	45.790	1.547	42.726	48.854
		15	No	23.680	1.547	20.616	26.744
			Add	74.800	1.547	71.736	77.864
	Sucrose	5	No	2.800	1.547	-.264	5.864
			Add	4.920	1.547	1.856	7.984
		10	No	3.230	1.547	.166	6.294
			Add	11.340	1.547	8.276	14.404
		15	No	3.440	1.547	.376	6.504
			Add	26.050	1.547	22.986	29.114

ตารางที่ 28 (ต่อ)

Temperature	Cryoprotectant	Percent	CaCo3	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
75	Control	0	No	.117	1.547	-2.948	3.181
	Lactose	5	No	18.947	1.547	15.882	22.011
			Add	27.033	1.547	23.969	30.098
		10	No	21.417	1.547	18.352	24.481
			Add	44.923	1.547	41.859	47.988
	Glucose	15	No	26.820	1.547	23.756	29.884
			Add	92.287	1.547	89.222	95.351
		5	No	.103	1.547	-2.961	3.168
			Add	25.750	1.547	22.686	28.814
		10	No	.120	1.547	-2.944	3.184
			Add	36.080	1.547	33.016	39.144
		15	No	19.000	1.547	15.936	22.064
			Add	56.840	1.547	53.776	59.904
	Sucrose	5	No	.440	1.547	-2.624	3.504
			Add	1.170	1.547	-1.894	4.234
		10	No	.470	1.547	-2.594	3.534
			Add	2.980	1.547	-.084	6.044
		15	No	1.587	1.547	-1.478	4.651
			Add	12.940	1.547	9.876	16.004

ตารางที่ 28 (ต่อ)

Temperature	Cryoprotectant	Percent	CaCo3	Mean	Std.	95% Confidence Interval	
					Error	Lower Bound	Upper Bound
90	Control	0	No	.087	1.547	-2.978	3.151
		5	No	1.733	1.547	-1.331	4.798
			Add	25.017	1.547	21.952	28.081
		10	No	1.803	1.547	-1.261	4.868
			Add	37.467	1.547	34.402	40.531
		15	No	4.430	1.547	1.366	7.494
	Glucose		Add	78.623	1.547	75.559	81.688
		5	No	.200	1.547	-3.044	3.084
			Add	7.997	1.547	4.932	11.061
		10	No	.110	1.547	-2.954	3.174
			Add	35.000	1.547	31.936	38.064
		15	No	1.090	1.547	-1.974	4.154
	Sucrose		Add	36.820	1.547	33.756	39.884
		5	No	.400	1.547	-3.024	3.104
			Add	.610	1.547	-2.454	3.674
		10	No	.600	1.547	-3.004	3.124
			Add	1.480	1.547	-1.584	4.544
		15	No	.470	1.547	-2.594	3.534
			Add	5.870	1.547	2.806	8.934

จากตารางที่ 28 แสดงตัวแปรร่วมระหว่างอุณหภูมิในช่วงทำแห้ง ชนิดและปริมาณของสารป้องกันความเย็นกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C ร่วมกับการเติมแลคโตส 15 % และการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด 99.66 %

การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 90 °C โดยที่ไม่เติมสารป้องกันความชื้นและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 0.87%



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาที่อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60, 75 และ 90 °C ชนิดของสารป้องกันความเย็น แลคโตส, กลูโคส และซูโครส ปริมาณการเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10 และ 15 % และการเติมหรือไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*

1. การใช้อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 °C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด เมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งเพิ่มขึ้นจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลง ทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้งจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงตามลำดับการใช้สารป้องกันความเย็นดังนี้ แลคโตส กลูโคส ซูโครส และการไม่เติมสารป้องกันความเย็น ทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้งจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณของสารป้องกันความเย็นดังนี้ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10 และ 15 % ทุกอุณหภูมิในช่วงทำแห้งจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นถ้าเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

2. การเติมแลคโตสเป็นสารป้องกันความเย็น จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด การใช้สารป้องกันความเย็นทุกชนิดจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งสูงขึ้น ทุกชนิดของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณการเติมสารป้องกันความเย็นดังนี้ การไม่เติมสารป้องกันความเย็น การเติมสารป้องกันความเย็น 5, 10, และ 15 % ทุกชนิดของสารป้องกันความเย็น จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

3. การเติมสารป้องกันความเย็น 15 % จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งมากที่สุด การใช้สารป้องกันความเย็นที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นส่งผลให้การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งสูงขึ้นที่อุณหภูมิเดียวกัน ทุกปริมาณของสารป้องกันความเย็นจะมีการรอดชีวิต

4. ของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งสูงขึ้น ทุกปริมาณของสารป้องกันความชื้นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงตามลำดับการใช้สารป้องกันความชื้นดังนี้ แลคโตส กลูโคส ซูโครส และการไม่เติมสารป้องกันความชื้น ทุกปริมาณของสารป้องกันความชื้นจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

5. การเติมแคลเซียมคาร์บอเนต จะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งสูงกว่าการไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต การเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งสูงขึ้น การเติมและไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งลดลงตามลำดับชนิดของสารป้องกันความชื้นดังนี้ แลคโตส กลูโคส ซูโครส และการไม่เติมสารป้องกันความชื้น การเติมและไม่เติมเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งเพิ่มขึ้นตามลำดับปริมาณการเติมสารป้องกันความชื้นดังนี้ การไม่เติมสารป้องกันความชื้น การเติมสารป้องกันความชื้น 5, 10, และ 15 %

6. ระยะเวลาในการทำแห้ง 48 ชั่วโมง ความชื้นต่ำกว่า 18 % ระยะเวลาในการทำแห้งเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ความชื้น ที่อุณหภูมิในช่วงทำแห้งเดียวกันเมื่อระยะเวลาในการทำแห้งเพิ่มขึ้นความชื้นจะลดลง ที่ระยะเวลาเดียวกันเมื่ออุณหภูมิในช่วงทำแห้งเพิ่มขึ้นความชื้นจะลดลง

7. ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* เมื่อพิจารณาจากการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด คือ อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง 60 องศาเซลเซียส ใช้แลคโตส 15 เปอร์เซ็นต์เป็นสารป้องกันความชื้น ร่วมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษารูปแบบของบรรจุภัณฑ์สำหรับใส่วัตถุดิบ เพราะอาจมีผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ฝ่ายโรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ 128 น.
- จำเนียร สัตยาพันธุ์. 2534. รายงานผลการวิจัย เรื่องการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของสัตว์ชนิดต่างๆ ร่วมกับ ซูโครสในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูขาว. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 421-427
- เขาว์ อินทร์ประสิทธิ์. 2544. เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วนสำหรับอาหาร. โครงการวิจัย ประเภท ข รหัส KPI 73. 41. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ตรี วาทกิจ. อุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำ. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนมแหล่งที่มา:
http://agri.npu.ac.th/publication/Aj.TREE/agro_fishery/frozen.ppt, 18 April 2553.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 735 น.
- นภา โล่ห์ทอง. 2543. เทคโนโลยีชีวภาพกับการพัฒนาการผลิตอาหารหมัก. เทคโนโลยีชีวภาพ
- บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด. 2545. คู่มือการใช้เครื่อง HI-LITE. 32 หน้า
- ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2547. “แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง” วารสารครุศาสตร์
อุตสาหกรรม ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2547 หน้า 66 – 67
- พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. 2547. “การใช้ประโยชน์จุลินทรีย์เพื่ออุตสาหกรรม
การเลี้ยงสัตว์อย่างยั่งยืน” วารสาร LAB. TODAY ปีที่ 3 ฉบับที่ 18 พ.ศ. 2547 หน้า
58-62

รสลิน ธนทิพกุล, 2547. วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาปัจจัยการฟองตัวของมอลต์สกัดจาก
กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบางส่วน. วิศวกรรมอาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วาสนา กิตติกรรัตน์. 2547. วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาอายุการเก็บ *Bacillus subtilis*.
เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี

วิภาพรรณ ผจงวิริยาทร, เทคโนโลยี Freeze-Drying, R&D Newsletter ปีที่ 10 ฉบับที่ 2, 2546

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2544. โปรไบโอติกผลิตภัณฑ์อาหาร
เสริมของไก่. แหล่งที่มา: http://www.tistr.or.th/tistr2006/main_data/report/index.php, 18
July 2549.

สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์, 2544. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
193 น.

สุวรรณา กิจภากรณ์, 2525. ผลิตภัณฑ์จากน้ำมัน, หน้า 11 – 12

เอกฉนัย กอกิมพงษ์. 2548. “เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง” วารสาร LAB. TODAY ฉบับเดือน
สิงหาคม 2548 หน้า 27 – 32

anonymous, 2005. **Nutrition business journal. Health & Functional Foods report 2004.**
Available Source: <http://store.yahoo.com/nbj/funfoodinrep.html>, 20 May 2006.

Fellows, P. J. 1990. **Food technology principles and practice.** Ellis Horwood Limited,
Great Britain.

Guide to freeze drying for the laboratory, Lobconco Corporation

- Junge, H., Krebs, B. and Kilian, M., 2000. **Strain selection, production, and formulation of the biological plant vitality enhancing agent FZB24 *Bacillus subtilis***. Poultry Science Journal, Vol. 69, pp. 1966-1973.
- Leonard Frank. 1963. **Proline Metabolism in *Escherichia coli***. Biochemistry, The Johns Hopkins University
- Litvin, S., Mannheim, C.H. and Miltz, J. 1998. **Dehydration of carrots by a freeze drying microwave heating and air or vacuum drying**. J. Food Eng. 36, 1: 103-111.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R. Mogensen, G. Ronden, R. and M. Saarela. 2002. **Technological challenges for future probiotic foods**. International Dairy Journal. pp: 173-182.
- Phanindra, H.SK., et al. 2001. **Effect of combination drying on the physico-chemical characteristics of carrot and pumpkin**. J. Food Proc Pres. 25, 6: 447-460.
- Schadle, E. R., Burns, E. E. and Talley, L. J. 1983. **Forced air drying of partially freeze-dried compressed carrot bars**. J. Food Sci. 48, 1: 193-196
- Sempex. 2005. **Freeze-Dry Foods**. Available Source: <http://www.freeze-dry.com/tech/benefits.html>, 7 June 2006.
- Wikipedia. 2006. **Freeze drying**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Freeze_drying, 23 August 2006.
- Yi-Chieh Wang. 2003. **Viability of lactic bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage**. Graduate Institute of Food Science and Technology.
- Snowman, John W. 1988. **Downstream Processes: Equipment and Techniques**. Alan R. Liss, Inc. : pages 315-351



ตารางผนวกที่ 1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบค่า Activity ของ จุลินทรีย์ในการทดลองครั้งที่ 1

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant					
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carbomite	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)			
			60	75	90	
Control	0	ไม่เติม	1.1	0.01	0.02	
			1.6	0.07	0.03	
			2.7	0.07	0.01	
	Lactose	5	เติม	71.7	29.2	23.1
				72.8	21.9	24.4
				84.4	24.8	24.2
			ไม่เติม	56.7	12.6	2.2
				47.5	21.2	1.2
				49.6	22.5	3.2
10		เติม	83.1	47.2	34.1	
			81.7	48.5	31.6	
			85.1	41.6	40.8	
	ไม่เติม	54.3	26.5	1.1		
		53.5	25.6	1.3		
		56.9	13.3	3		
15	เติม	99.7	97.9	76.1		
		99.4	91.1	78.8		
		99.9	87.8	74.8		
	ไม่เติม	64.7	23.6	3.8		
		64.8	25.6	3.1		
		67.0	19.6	4.8		

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของสาร Cryoprotectant	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant				
	ปริมาณการ เติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carbomite	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
Glucose	5		60	75	90
			38.4	21.4	7.8
		เติม	34.7	25.8	7.2
			40.5	24.6	6.9
			14.6	0.06	0.01
		ไม่เติม	13.8	0.06	0.04
	10		7.6	0.18	0.01
			48.0	34.4	32.3
		เติม	47.8	38.9	38.9
			42.1	30.6	27.5
			5.2	0.07	0.09
		ไม่เติม	9.4	0.1	0.05
	15		15.0	0.19	0.1
			71.0	59.8	35.9
		เติม	70.5	51.6	32.1
			85.9	59.0	34.9
			29.3	14.3	0.2
		ไม่เติม	23.2	15.7	0.5
			21.3	22.2	1.7

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant				
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร	การเติม Calcium Carbodate	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	Cryoprotectant (%)		60	75	90
Sucrose	5		9.0	1.4	0.1
		เติม	1.6	1.7	0.2
			1.4	2.5	1.2
			4.0	0.9	0.01
		ไม่เติม	1.1	0.2	0.03
			0.9	0.4	0.02
	10		9.0	1.3	1.2
		เติม	4.7	1.5	1.6
			10.3	3.0	2.9
			3.9	0.7	0.2
		ไม่เติม	2.1	0.5	0.2
			5.7	0.3	0.05
	15		25.0	15.3	7.3
		เติม	20.5	13.7	7.1
			35.5	13.0	9.3
			3.9	1.3	0.5
		ไม่เติม	4.8	1.1	0.5
			12.3	1.5	1.4

ตารางผนวกที่ 2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบค่า Activity ของ จุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งที่ 2

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant				
Cryoprotectant	ปริมาณการเติม	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	สาร	Calcium	60	75	90
	Cryoprotectant (%)	Carbornate			
Control	0	ไม่เติม	1.1	0.01	0.04
			1.5	0.02	0.01
			3.1	0.24	0.01
	5	เติม	74.0	32.9	28.3
			70.2	35.9	22.4
			95.5	24.8	29.7
Lactose	10	ไม่เติม	56.6	10.2	2.2
			52.7	15.1	2.2
			50.0	20.3	1.9
		เติม	89.3	45.7	39.4
			81.1	48.8	33.1
			85.0	30.9	28.9
	15	ไม่เติม	59.4	27.6	1.3
			52.3	25.5	1.1
			58.7	10.2	3.5
		เติม	99.4	95.7	74.6
			99.6	99.1	77.8
			99.9	79.4	79.7
	20	ไม่เติม	67.4	22.3	9.3
			67.4	25.5	2.3
			56.4	23.6	0.9

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant			
Cryoprotectant	ปริมาณการเติม	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)	
	สาร	Calcium	60	75
	Cryoprotectant	Carbomite		90
	(%)			
Glucose	5		31.8	24.1
		เติม	30.4	24.5
			46.3	26.2
			17.4	0.07
		ไม่เติม	16.3	0.07
			7.7	0.3
	10		41.8	37.4
		เติม	40.7	35.8
			57.8	36.0
			13.5	0.1
		ไม่เติม	13.9	0.1
			10.9	0.13
	15		73.1	57.9
		เติม	70.0	58.1
			83.6	51.0
			28.9	15.4
		ไม่เติม	24.3	11.5
			18.5	27.1

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant				
Cryoprotectant	ปริมาณการเติม	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	สาร	Calcium	60	75	90
	Cryoprotectant	Carbomite			
	(%)				
Sucrose	5	เติม	4.9	1.3	0.4
			1.1	0.3	0.7
			3.0	0.7	0.2
		ไม่เติม	6.4	0.7	0.01
			0.1	0.2	0.01
			0.7	0.3	0.01
	10	เติม	3.9	6.1	1.8
			3.4	1.1	1.7
			11.6	7.8	3.7
		ไม่เติม	0.7	0.3	0.01
			1.3	0.2	0.02
			2.8	0.9	0.03
	15	เติม	21.5	15.5	2.7
			30.0	23.3	2.7
			35.5	21.2	4.5
		ไม่เติม	3.3	1.1	0.1
			1.4	1.1	0.1
			1.0	1.1	0.4

ตารางผนวกที่ 3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการตรวจสอบค่า Activity ของ จุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งที่ 3

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant					
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carbomite	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)			
			60	75	90	
Control	0	ไม่เติม	3.1	0.4	0.3	
			4.1	0.2	0.3	
			2.4	0.03	0.06	
	Lactose	5	เติม	76.1	26.9	27.3
				80.7	18.2	22.4
				85.6	28.7	23.2
			ไม่เติม	53.6	14.2	0.5
				52.4	25.1	2.1
				59.5	29.2	0.1
		10	เติม	91.8	44.7	37.4
				94.0	49.8	44.3
				99.1	47.0	47.6
ไม่เติม			56.4	29.6	1.2	
			64.5	16.2	2.1	
			66.9	18.2	1.5	
15	เติม	99.9	99.7	77.6		
		99.1	89.9	88.7		
		99.8	89.9	79.4		
	ไม่เติม	64.4	29.3	3.1		
		77.6	36.2	3.3		
		68.3	35.5	9.2		

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของสาร Cryoprotectant	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant				
	ปริมาณการ เติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carbomite	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
			60	75	90
			36.8	21.1	12.7
		เติม	39.4	34.2	7.2
	5		41.1	29.7	15.5
			5.1	0.01	0.01
		ไม่เติม	1.1	0.07	0.01
			7.2	0.1	0.01
			41.8	33.4	39.2
		เติม	47.7	44.3	33.8
	10		44.3	33.9	38.0
			8.5	0.02	0.09
		ไม่เติม	13.9	0.18	0.01
			8.6	0.19	0.29
			79.1	54.9	31.5
		เติม	70.0	56.1	46.3
	15		69.8	62.9	33.2
			22.9	22.1	0.6
		ไม่เติม	23.3	22.1	1.2
			21.4	20.6	2.5

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของสาร	ค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของจุลินทรีย์ตามปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant				
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร	การเติม Calcium Carbodate	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	Cryoprotectant (%)		60	75	90
Sucrose	5		8.9	1.8	0.8
		เติม	2.1	0.1	0.6
			12.2	0.6	1.1
			5.4	0.5	0.04
		ไม่เติม	1.1	0.5	0.01
			5.5	0.1	0.2
	10		12.9	1.6	0.12
		เติม	20.4	1.2	0.13
			25.8	3.2	0.17
			7.3	0.4	0.01
		ไม่เติม	2.0	0.3	0.01
			3.2	0.6	0.01
	15		22.5	5.1	6.7
		เติม	20.0	2.1	7.7
			23.9	7.2	4.8
			1.8	1.6	0.8
		ไม่เติม	1.4	2.1	0.3
			1.0	3.6	0.1

ตารางผนวกที่ 4 แสดงค่าการเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อในการทดลองครั้งที่ 1

ชนิดของสาร	จำนวนการเหลือรอดของจุลินทรีย์							
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)							
	ปริมาณการเติมสาร Cryopro tectant (%)	การเติม Calcium Carbor nate	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)					
			60		75		90	
			ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง
Control	0	ไม่เติม	1.56×10^8	3.05×10^6	1.90×10^8	2.04×10^5	1.72×10^8	1.80×10^5
			1.60×10^8	3.58×10^6	1.07×10^8	2.40×10^5	1.25×10^8	1.10×10^5
			5.90×10^7	2.94×10^6	3.00×10^6	2.31×10^5	6.00×10^6	8.80×10^4
Lactose	5	ไม่เติม	1.75×10^8	1.80×10^8	1.62×10^8	2.12×10^7	1.56×10^8	3.14×10^7
			1.18×10^8	1.25×10^8	1.20×10^8	2.24×10^7	1.60×10^8	3.40×10^7
			2.56×10^8	1.21×10^8	2.40×10^7	3.86×10^7	5.60×10^7	2.52×10^7
		เติม	1.57×10^8	5.85×10^7	1.75×10^8	2.25×10^7	1.50×10^8	2.77×10^6
			1.45×10^8	5.58×10^7	1.52×10^8	2.85×10^7	1.17×10^8	2.05×10^6
			1.00×10^8	4.47×10^7	3.90×10^7	1.53×10^7	1.62×10^8	2.41×10^6
	10	ไม่เติม	1.57×10^8	1.90×10^8	1.69×10^8	7.30×10^7	1.61×10^8	7.18×10^7
			1.99×10^8	1.26×10^8	1.73×10^8	7.06×10^7	1.51×10^8	7.07×10^7
			7.30×10^7	5.90×10^7	1.83×10^8	8.44×10^7	2.73×10^8	7.05×10^7
		เติม	1.72×10^8	6.48×10^7	1.50×10^8	2.03×10^7	1.71×10^8	2.50×10^6
			1.44×10^8	6.05×10^7	1.40×10^8	2.07×10^7	1.25×10^8	2.06×10^6
			4.70×10^8	8.17×10^7	4.60×10^7	2.83×10^7	7.30×10^7	1.80×10^6
	15	ไม่เติม	1.67×10^8	1.80×10^8	1.91×10^8	1.88×10^8	1.57×10^8	8.33×10^7
			1.18×10^8	1.09×10^8	1.68×10^8	1.15×10^8	1.53×10^8	8.12×10^7
			1.83×10^8	1.40×10^8	7.00×10^7	3.30×10^7	3.20×10^8	9.35×10^7
		เติม	1.20×10^8	7.49×10^7	1.35×10^8	5.20×10^7	1.47×10^8	5.34×10^6
			1.34×10^8	7.03×10^7	1.32×10^8	5.04×10^7	1.98×10^8	5.49×10^6
			1.24×10^8	9.18×10^7	3.18×10^8	4.76×10^7	5.40×10^7	6.27×10^6

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ชนิดของสาร	จำนวนการเหลือรอดของจุลินทรีย์					
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)					
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carborate	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)			
			60		75	
			ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง
			60	75	90	
Glucose	5	เติม	1.55x10 ⁸	4.25x10 ⁷	1.10x10 ⁸	3.87x10 ⁷
			1.22x10 ⁸	4.21x10 ⁷	1.18x10 ⁸	3.18x10 ⁷
			9.80x10 ⁷	3.84x10 ⁷	1.62x10 ⁸	2.70x10 ⁷
		ไม่เติม	1.00x10 ⁸	1.63x10 ⁷	1.17x10 ⁸	1.60x10 ⁵
			1.76x10 ⁸	1.21x10 ⁷	1.76x10 ⁸	1.35x10 ⁵
			1.11x10 ⁸	9.40x10 ⁶	8.80x10 ⁷	8.00x10 ⁴
	10	เติม	1.93x10 ⁸	6.00x10 ⁷	1.80x10 ⁸	3.50x10 ⁷
			1.20x10 ⁸	6.78x10 ⁷	1.25x10 ⁸	3.55x10 ⁷
			7.10x10 ⁷	6.06x10 ⁷	7.60x10 ⁷	2.73x10 ⁷
		ไม่เติม	1.00x10 ⁸	1.80x10 ⁷	1.20x10 ⁸	1.50x10 ⁵
			1.28x10 ⁸	1.32x10 ⁷	1.25x10 ⁸	1.64x10 ⁵
			1.53x10 ⁸	5.70x10 ⁶	1.21x10 ⁸	4.60x10 ⁴
Glucose	15	เติม	1.50x10 ⁸	8.50x10 ⁷	1.76x10 ⁸	7.55x10 ⁷
			1.35x10 ⁸	8.47x10 ⁷	1.35x10 ⁸	7.30x10 ⁷
			6.90x10 ⁷	7.93x10 ⁷	7.00x10 ⁷	6.51x10 ⁷
		ไม่เติม	1.10x10 ⁸	3.40x10 ⁷	1.70x10 ⁸	3.90x10 ⁷
			1.24x10 ⁸	3.47x10 ⁷	1.19x10 ⁸	3.70x10 ⁷
			3.36x10 ⁸	4.53x10 ⁷	2.21x10 ⁸	4.10x10 ⁷

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ชนิดของสาร	จำนวนการเล็หรือคของจุลินทรีย์					
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)					
	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)					
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร	การเติม				
	Cryoprotectant (%)	Carborate				
			60		75	
			ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง
Sucrose	5	เติม	1.19×10^8	5.09×10^6	1.08×10^8	1.09×10^6
			1.90×10^8	5.91×10^6	1.81×10^8	1.93×10^6
			2.01×10^8	6.40×10^6	1.91×10^8	1.48×10^6
		ไม่เติม	1.60×10^8	4.44×10^6	1.80×10^8	4.20×10^5
			1.84×10^8	4.68×10^6	1.72×10^8	4.58×10^5
			1.60×10^7	3.18×10^6	2.18×10^8	4.12×10^5
	10	เติม	1.40×10^8	1.83×10^7	1.80×10^8	2.70×10^6
			1.78×10^8	1.58×10^7	1.67×10^8	2.58×10^6
			4.20×10^7	2.20×10^6	1.90×10^7	1.32×10^6
		ไม่เติม	1.07×10^8	4.85×10^6	1.02×10^8	6.38×10^5
			1.18×10^8	4.10×10^6	1.13×10^8	6.14×10^5
			1.29×10^8	3.59×10^6	1.45×10^8	6.02×10^5
Sucrose	15	เติม	1.51×10^8	3.47×10^7	1.32×10^8	1.20×10^7
			1.14×10^8	3.13×10^7	1.12×10^8	1.13×10^7
			8.60×10^7	2.94×10^7	1.07×10^8	1.33×10^7
		ไม่เติม	1.63×10^8	3.50×10^6	1.20×10^8	3.80×10^6
			1.55×10^8	3.12×10^6	1.68×10^8	3.91×10^6
			3.80×10^7	2.89×10^6	5.40×10^7	1.68×10^6

ตารางผนวกที่ 5 แสดงค่าการเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อในการทดลองครั้งที่ 2

ชนิดของสาร	จำนวนการเหลือรอดของจุลินทรีย์							
สาร	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)							
Cryoprotectant	ปริมาณการ	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)					
	เติมสาร	Calcium	60		75		90	
	Cryoprotectant (%)	Carborate	ก่อนทำ	หลังทำ	ก่อนทำ	หลังทำ	ก่อนทำ	หลังทำ
			แห้ง	แห้ง	แห้ง	แห้ง	แห้ง	แห้ง
Control	0	ไม่เติม	1.08x10 ⁸	3.72x10 ⁶	1.01x10 ⁸	2.18x10 ⁵	1.20x10 ⁸	1.43x10 ⁵
			1.85x10 ⁸	3.25x10 ⁶	1.16x10 ⁸	2.89x10 ⁵	1.07x10 ⁸	1.18x10 ⁵
			1.81x10 ⁸	4.88x10 ⁶	9.20x10 ⁷	2.55x10 ⁵	1.21x10 ⁸	2.37x10 ⁵
		เติม	1.22x10 ⁸	1.21x10 ⁸	1.21x10 ⁸	2.19x10 ⁷	1.19x10 ⁸	3.18x10 ⁷
			1.27x10 ⁸	1.11x10 ⁸	1.12x10 ⁸	2.94x10 ⁷	1.97x10 ⁸	3.83x10 ⁷
			1.05x10 ⁸	1.43x10 ⁸	1.27x10 ⁸	1.59x10 ⁷	1.64x10 ⁸	3.19x10 ⁷
	5	ไม่เติม	1.18x10 ⁸	5.27x10 ⁷	1.26x10 ⁸	2.23x10 ⁷	1.19x10 ⁸	2.18x10 ⁶
			1.80x10 ⁸	5.70x10 ⁷	1.65x10 ⁸	2.30x10 ⁷	1.98x10 ⁸	2.80x10 ⁶
			1.37x10 ⁸	5.77x10 ⁷	1.65x10 ⁸	4.02x10 ⁷	3.40x10 ⁷	1.17x10 ⁶
		เติม	1.15x10 ⁸	1.10x10 ⁸	1.23x10 ⁸	7.13x10 ⁷	1.47x10 ⁸	7.10x10 ⁷
			1.50x10 ⁸	1.00x10 ⁸	1.35x10 ⁸	7.35x10 ⁷	1.70x10 ⁸	7.00x10 ⁷
			3.32x10 ⁸	1.68x10 ⁸	2.61x10 ⁸	6.70x10 ⁷	1.36x10 ⁸	7.11x10 ⁷
Lactose	10	ไม่เติม	1.56x10 ⁸	6.10x10 ⁷	1.30x10 ⁸	2.27x10 ⁷	1.16x10 ⁸	2.80x10 ⁶
			1.60x10 ⁸	6.00x10 ⁷	1.00x10 ⁸	2.34x10 ⁷	1.18x10 ⁸	2.25x10 ⁶
			1.16x10 ⁸	6.05x10 ⁷	1.90x10 ⁸	1.60x10 ⁷	1.30x10 ⁸	2.80x10 ⁶
		เติม	1.56x10 ⁸	1.14x10 ⁸	1.52x10 ⁸	1.85x10 ⁸	1.34x10 ⁸	8.13x10 ⁷
			1.60x10 ⁸	1.40x10 ⁸	1.25x10 ⁸	1.27x10 ⁸	1.16x10 ⁸	8.37x10 ⁷
			7.30x10 ⁷	3.80x10 ⁷	2.27x10 ⁸	3.30x10 ⁷	2.09x10 ⁸	7.86x10 ⁷
	15	ไม่เติม	1.13x10 ⁸	7.13x10 ⁷	1.71x10 ⁸	5.72x10 ⁷	1.81x10 ⁸	5.69x10 ⁶
			1.37x10 ⁸	7.36x10 ⁷	1.10x10 ⁸	5.20x10 ⁷	1.10x10 ⁸	5.98x10 ⁶
			1.52x10 ⁸	6.60x10 ⁷	1.15x10 ⁸	4.20x10 ⁷	3.03x10 ⁸	4.80x10 ⁶

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

ชนิดของสาร	จำนวนการเหลือรอดของจุลินทรีย์								
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)								
Cryoprotectant	ปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carborate	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)						
			60		75		90		
			ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	
Glucose	5	เติม		1.75×10^8	4.15×10^7	1.40×10^8	3.60×10^7	1.10×10^8	1.30×10^7
				1.21×10^8	4.24×10^7	1.26×10^8	3.21×10^7	1.19×10^8	1.63×10^7
				2.35×10^8	5.11×10^7	1.15×10^8	2.73×10^7	1.31×10^8	7.00×10^5
		ไม่เติม		1.30×10^8	1.10×10^7	1.00×10^8	1.80×10^5	1.27×10^8	2.35×10^4
				1.21×10^8	1.60×10^7	1.28×10^8	1.42×10^5	1.23×10^8	2.21×10^4
				3.19×10^8	2.10×10^7	2.82×10^8	1.28×10^5	2.60×10^8	1.44×10^4
	10	เติม		1.12×10^8	6.05×10^7	1.70×10^8	3.80×10^7	1.80×10^8	3.78×10^7
				1.20×10^8	6.17×10^7	1.18×10^8	3.08×10^7	1.07×10^8	3.08×10^7
				3.08×10^8	8.18×10^7	2.22×10^8	3.92×10^7	1.93×10^8	3.64×10^7
		ไม่เติม		1.80×10^8	1.27×10^7	1.75×10^8	1.80×10^5	1.37×10^8	1.25×10^5
				1.02×10^8	1.07×10^7	1.19×10^8	1.13×10^5	1.12×10^8	1.10×10^5
				2.28×10^8	1.56×10^7	6.60×10^7	7.00×10^3	5.10×10^7	3.35×10^5
	15	เติม		1.00×10^8	8.30×10^7	1.35×10^8	7.05×10^7	1.30×10^8	5.40×10^7
				1.13×10^8	8.13×10^7	1.10×10^8	7.13×10^7	1.14×10^8	5.13×10^7
				3.27×10^8	7.78×10^7	1.18×10^8	7.75×10^7	1.46×10^8	5.34×10^7
		ไม่เติม		1.33×10^8	3.24×10^7	1.30×10^8	3.35×10^7	1.00×10^8	1.30×10^6
				1.12×10^8	3.13×10^7	1.13×10^8	3.10×10^7	1.13×10^8	1.12×10^6
				1.39×10^8	3.44×10^7	1.44×10^8	3.36×10^7	2.74×10^8	1.39×10^6

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

ชนิดของสาร	จำนวนการเลืกรอดของจุลินทรีย์					
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)					
	ปริมาณการเติมสาร	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)			
			60		75	
Cryoprotectant	Cryoprotectant (%)	Calcium Carbodate	ก่อนทำแห้ง		หลังทำแห้ง	
			60	75	90	
5	เติม	เติม	1.50x10 ⁸	5.19x10 ⁶	1.35x10 ⁸	1.22x10 ⁶
			1.11x10 ⁸	5.13x10 ⁶	1.12x10 ⁸	1.49x10 ⁶
			1.19x10 ⁸	5.46x10 ⁶	1.28x10 ⁸	1.01x10 ⁶
		ไม่เติม	1.20x10 ⁸	4.50x10 ⁶	1.80x10 ⁸	4.20x10 ⁵
			1.55x10 ⁸	4.88x10 ⁶	1.82x10 ⁸	4.89x10 ⁵
			1.18x10 ⁸	3.49x10 ⁶	7.00x10 ⁶	3.51x10 ⁵
	ไม่เติม	เติม	1.50x10 ⁸	1.20x10 ⁷	1.50x10 ⁸	2.37x10 ⁶
			1.82x10 ⁸	1.85x10 ⁷	1.63x10 ⁸	2.38x10 ⁶
			3.10x10 ⁷	2.50x10 ⁶	4.70x10 ⁷	1.25x10 ⁶
		ไม่เติม	1.00x10 ⁸	4.20x10 ⁶	1.75x10 ⁸	6.79x10 ⁵
			1.82x10 ⁸	4.87x10 ⁶	1.16x10 ⁸	6.90x10 ⁵
			2.58x10 ⁸	5.33x10 ⁶	9.0x10 ⁶	6.71x10 ⁵
10	เติม	เติม	1.60x10 ⁸	3.47x10 ⁷	1.46x10 ⁸	1.81x10 ⁷
			1.05x10 ⁸	3.70x10 ⁷	1.60x10 ⁸	1.10x10 ⁷
			2.45x10 ⁸	4.23x10 ⁷	2.04x10 ⁸	6.90x10 ⁶
		ไม่เติม	1.78x10 ⁸	3.71x10 ⁶	1.81x10 ⁸	3.77x10 ⁶
			1.85x10 ⁸	3.17x10 ⁶	1.10x10 ⁸	3.70x10 ⁶
			3.77x10 ⁸	4.22x10 ⁶	1.29x10 ⁸	2.43x10 ⁶
15	เติม	เติม	1.30x10 ⁷	6.14x10 ⁵		
		ไม่เติม				

ตารางผนวกที่ 6 แสดงค่าการเหลือรอดของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อในการทดลองครั้งที่ 3

ชนิดของสาร	จำนวนการเหลือรอดของจุลินทรีย์							
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)							
	ปริมาณการเติมสาร Cryoprotectant (%)	การเติม Calcium Carborate	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)					
			60		75		90	
			ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง
Control	0	ไม่เติม	1.59x10 ⁸	3.05x10 ⁶	3.20x10 ⁸	3.05x10 ⁵	3.18x10 ⁸	1.80x10 ⁵
			1.95x10 ⁸	3.51x10 ⁶	3.07x10 ⁸	3.52x10 ⁵	3.89x10 ⁸	1.27x10 ⁵
			3.00x10 ⁷	4.42x10 ⁶	3.21x10 ⁸	3.63x10 ⁵	2.35x10 ⁸	2.39x10 ⁵
	5	เติม	2.11x10 ⁸	1.68x10 ⁸	5.80x10 ⁷	3.73x10 ⁷	6.80x10 ⁷	2.37x10 ⁷
			2.13x10 ⁸	1.80x10 ⁸	3.30x10 ⁷	1.00x10 ⁷	8.20x10 ⁷	2.75x10 ⁷
			3.44x10 ⁸	1.50x10 ⁷	4.55x10 ⁷	4.00x10 ⁷	2.44x10 ⁷	1.80x10 ⁷
ไม่เติม		4.38x10 ⁷	1.00x10 ⁷	3.80x10 ⁷	1.30x10 ⁷	1.27x10 ⁸	2.11x10 ⁶	
		4.80x10 ⁷	1.00x10 ⁷	3.70x10 ⁷	1.00x10 ⁷	1.75x10 ⁸	2.10x10 ⁶	
		4.23x10 ⁷	1.00x10 ⁷	9.00x10 ⁷	2.29x10 ⁷	1.84x10 ⁸	3.02x10 ⁶	
10		เติม	8.50x10 ⁷	7.20x10 ⁷	1.59x10 ⁸	8.65x10 ⁷	2.26x10 ⁸	7.30x10 ⁷
			5.00x10 ⁷	2.50x10 ⁷	1.90x10 ⁸	8.54x10 ⁷	2.65x10 ⁸	7.00x10 ⁷
			8.40x10 ⁷	8.00x10 ⁷	2.00x10 ⁸	8.13x10 ⁷	3.28x10 ⁸	6.85x10 ⁷
	ไม่เติม	8.26x10 ⁷	3.60x10 ⁷	2.92x10 ⁷	2.60x10 ⁷	8.90x10 ⁸	1.61x10 ⁶	
		8.67x10 ⁷	6.00x10 ⁷	6.10x10 ⁷	2.20x10 ⁷	9.50x10 ⁸	1.10x10 ⁶	
		7.58x10 ⁷	4.50x10 ⁷	5.10x10 ⁷	3.37x10 ⁷	3.50x10 ⁸	2.69x10 ⁶	
Lactose	เติม	1.75x10 ⁸	1.73x10 ⁸	7.00x10 ⁷	2.50x10 ⁷	9.21x10 ⁷	2.40x10 ⁷	
		1.51x10 ⁸	1.30x10 ⁸	5.00x10 ⁷	5.00x10 ⁷	9.15x10 ⁷	4.00x10 ⁷	
		2.46x10 ⁸	9.40x10 ⁷	9.00x10 ⁷	2.40x10 ⁷	9.69x10 ⁷	3.20x10 ⁷	
	ไม่เติม	1.21x10 ⁸	9.68x10 ⁷	3.00x10 ⁸	4.20x10 ⁷	2.00x10 ⁷	6.14x10 ⁶	
		1.10x10 ⁸	9.60x10 ⁷	3.52x10 ⁸	4.52x10 ⁷	5.10x10 ⁷	6.25x10 ⁶	
		1.41x10 ⁸	8.26x10 ⁷	3.02x10 ⁸	5.56x10 ⁷	9.10x10 ⁷	6.42x10 ⁶	

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชนิดของสาร	จำนวนการเลืกรอดของจุลินทรีย์					
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)					
	ปริมาณการเติมสาร	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)			
			60		75	
Cryoprotectant	Cryoprotectant (%)	Carborate	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง
			60	75	90	
Glucose	5	เติม	1.19x10 ⁸	6.20x10 ⁷	2.95x10 ⁸	4.90x10 ⁷
			1.80x10 ⁸	6.89x10 ⁷	2.79x10 ⁸	4.96x10 ⁷
			5.21x10 ⁷	1.00x10 ⁷	5.05x10 ⁷	3.20x10 ⁷
		ไม่เติม	1.90x10 ⁸	1.13x10 ⁷	1.30x10 ⁷	8.00x10 ⁵
			1.11x10 ⁸	1.81x10 ⁷	7.80x10 ⁷	8.80x10 ⁵
			2.00x10 ⁷	1.35x10 ⁷	8.00x10 ⁶	6.00x10 ⁵
	10	เติม	1.55x10 ⁸	6.10x10 ⁷	4.10x10 ⁷	2.00x10 ⁷
			1.81x10 ⁸	6.92x10 ⁷	7.10x10 ⁷	4.83x10 ⁷
			5.34x10 ⁷	4.50x10 ⁷	5.59x10 ⁷	8.00x10 ⁶
		ไม่เติม	1.00x10 ⁷	3.50x10 ⁶	2.70x10 ⁸	3.50x10 ⁵
			7.70x10 ⁶	3.00x10 ⁶	2.75x10 ⁸	3.95x10 ⁵
			1.46x10 ⁷	5.00x10 ⁶	1.24x10 ⁸	2.42x10 ⁵
Glucose	15	เติม	1.03x10 ⁸	6.00x10 ⁷	1.60x10 ⁸	7.40x10 ⁷
			1.07x10 ⁸	8.30x10 ⁷	1.64x10 ⁸	7.57x10 ⁷
			9.93x10 ⁸	4.30x10 ⁷	1.20x10 ⁸	7.44x10 ⁷
			7.00x10 ⁷	1.00x10 ⁷	1.10x10 ⁸	1.40x10 ⁷
		ไม่เติม	8.10x10 ⁷	1.00x10 ⁷	1.94x10 ⁸	1.90x10 ⁷
			9.20x10 ⁷	3.88x10 ⁷	2.93x10 ⁸	2.55x10 ⁷

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชนิดของสาร	จำนวนการเหลือรอดของจุลินทรีย์							
	โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Plate Count Agar , CFU/ml)							
Cryoprotectant	ปริมาณการ	การเติม	อุณหภูมิในช่วงทำแห้ง (องศาเซลเซียส)					
	เต็มสาร	Calcium	60		75		90	
	Cryoprotectant (%)	Carborate	ก่อนทำ	หลังทำ	ก่อนทำ	หลังทำ	ก่อนทำ	หลังทำ
			แห้ง	แห้ง	แห้ง	แห้ง	แห้ง	แห้ง
Sucrose	5	เติม	1.90x10 ⁷	6.19x10 ⁶	1.70x10 ⁷	6.30x10 ⁵	1.27x10 ⁸	9.77x10 ⁵
			9.20x10 ⁷	6.90x10 ⁶	2.60x10 ⁷	3.00x10 ⁵	1.75x10 ⁸	9.70x10 ⁵
			7.50x10 ⁷	6.83x10 ⁶	2.00x10 ⁶	1.02x10 ⁶	1.66x10 ⁸	8.37x10 ⁵
		ไม่เติม	1.27x10 ⁸	4.58x10 ⁶	7.90x10 ⁷	5.64x10 ⁵	1.20x10 ⁸	5.70x10 ⁴
			1.70x10 ⁸	4.80x10 ⁶	2.00x10 ⁶	5.52x10 ⁵	1.67x10 ⁸	5.56x10 ⁴
			3.00x10 ⁸	3.25x10 ⁶	6.00x10 ⁶	6.54x10 ⁵	2.11x10 ⁸	6.08x10 ⁴
	10	เติม	2.60x10 ⁸	3.25x10 ⁷	7.60x10 ⁷	4.92x10 ⁶	1.00x10 ⁸	1.80x10 ⁶
			2.52x10 ⁸	3.07x10 ⁷	9.00x10 ⁶	4.30x10 ⁶	1.28x10 ⁸	1.27x10 ⁶
			2.05x10 ⁸	3.22x10 ⁷	1.07x10 ⁸	4.37x10 ⁶	2.28x10 ⁸	2.27x10 ⁶
		ไม่เติม	1.70x10 ⁸	3.60x10 ⁶	1.70x10 ⁸	5.60x10 ⁵	2.80x10 ⁸	7.00x10 ³
			1.26x10 ⁸	3.27x10 ⁶	1.26x10 ⁸	5.28x10 ⁵	2.27x10 ⁸	3.00x10 ³
			2.50x10 ⁷	3.09x10 ⁶	2.14x10 ⁸	5.08x10 ⁵	2.19x10 ⁸	1.40x10 ⁴
	15	เติม	7.00x10 ⁷	2.80x10 ⁷	1.40x10 ⁸	2.10x10 ⁷	2.50x10 ⁸	7.70x10 ⁶
			3.80x10 ⁷	2.34x10 ⁷	1.31x10 ⁸	2.35x10 ⁷	2.37x10 ⁸	7.35x10 ⁶
			1.65x10 ⁸	2.09x10 ⁷	8.30x10 ⁷	2.87x10 ⁷	1.34x10 ⁸	7.48x10 ⁶
			5.00x10 ⁶	3.50x10 ⁶	3.00x10 ⁸	3.20x10 ⁶	1.20x10 ⁸	5.18x10 ⁵
		ไม่เติม	3.30x10 ⁶	3.00x10 ⁶	3.34x10 ⁸	3.03x10 ⁶	1.00x10 ⁸	5.80x10 ⁵
			7.00x10 ⁶	3.91x10 ⁶	2.78x10 ⁸	4.45x10 ⁶	3.08x10 ⁸	6.63x10 ⁵

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวธีระพร เกลี้ยงข้า
เกิดวันที่	21 มิถุนายน พ.ศ. 2523
สถานที่เกิด	อำเภอลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (อุตสาหกรรมเกษตร) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน	หัวหน้าส่วนผลิต
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด (ในเครือเบทาโกร)