บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำส้มสายชู (Vinegar)

น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงรสสำหรับอาหารที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ใช้ในการถนอมอาหาร และใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารชนิดต่างๆ เช่น การผลิตผักและผลไม้กระป๋อง น้ำสลัด ไส้กรอก ซอสมะเขือเทศ และซอสพริก เป็นต้น น้ำส้มสายชูมีหลายชนิด ได้แก่ น้ำส้มสายชู-หมัก เป็นผลิตผลที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์ตามกรรมวิธีธรรมชาติ น้ำส้มสายชูที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ น้ำส้มสายชูกลั่น โดยนำแอลกอฮอล์กลั่นเจือจางมาหมักกับแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) แล้วนำมากลั่น หรือได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่น และน้ำส้มสายชูเทียม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำกรดอะซิติกมาเจือจาง โดยต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัม และไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำส้มสายชู คือ กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก (acetic acid) น้ำส้มสายชูหมักจะมีลักษณะเด่นกว่าน้ำส้มสายชูกลั่นและน้ำส้มสายชูเทียม คือ มีกลิ่นรสเฉพาะตามวัตถุดิบที่นำมาผลิต

สมัยก่อนในประเทศไทยผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำตาลเมาหรือกระแช่ แต่ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้วัตถุดิบหลากหลายขึ้น เช่น ธัญพืช ผลไม้ต่างๆ และกากน้ำตาล ทำให้น้ำส้มสายชูที่ได้มีลักษณะกลิ่นรสเฉพาะตัวที่แตกต่างกันไป การเลือกวัตถุดิบเพื่อนำมาผลิตน้ำส้มสายชูต้องคำนึงถึงสารอาหารที่ต้องมีเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก ในการผลิตน้ำส้มสายชูทางการค้ามักนิยมใช้น้ำผลไม้หรือสารละลายที่มีน้ำตาล หากน้ำผลไม้ที่นำมาใช้มีปริมาณน้ำตาลน้อย สามารถเติมน้ำตาลหรือทำการระเหยให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม จะใช้ผลิตกรดอะซิติกได้ 0.67 กรัม (จารุวรรณ, 2551; O'Toole and Lee, 2006)

2.1.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำส้มสายชู

การผลิตน้ำส้มสายชู ใช้กระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน ขั้นแรกการหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลที่มีในวัตถุดิบให้เป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ จากนั้นในขั้นตอนที่สองแอลกอฮอล์จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกโดยแบคทีเรียกรดอะซิติก

1) การหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation)

ยีสต์ที่ใช้ทั่วไปเป็นเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ และได้ผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆด้วย แต่ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น เช่น กลีเซอรอล และกรดอะซิติก เป็นต้น (วราวุฒิ, 2538) โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการเอมบ์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ในขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic process) ผลิตภัณฑ์หลัก คือ เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถอธิบายการหมักน้ำตาลได้ด้วยสมการทางเคมี Gay-Lussac ได้

$$\underset{\text{fermentable hexose (180g)}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{ethanol (92g)}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{carbon dioxide (88g)}}{2CO_2}$$

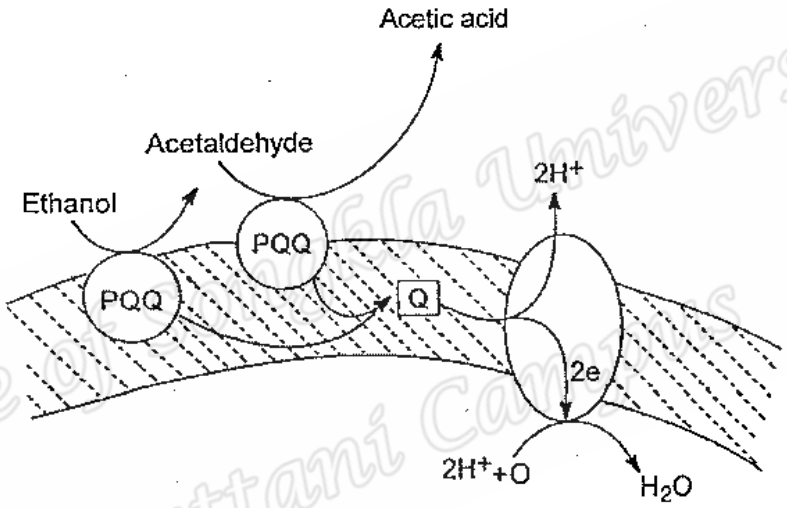
2) การผลิตกรดอะซิติก (Acetification)

แบคทีเรียกรดอะซิติกที่สำคัญ ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Gluconobacter* สามารถออกซิไดซ์เอทานอลได้เป็นกรดอะซิติกเพียงอย่างเดียว และให้ปริมาณกรดอะซิติกต่ำ และแบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียที่ออกซิไดซ์เอทานอลได้เป็นกรดอะซิติกสูง แต่มักจะเกิดการออกซิไดซ์เกิน (overoxidation) จะออกซิไดซ์กรดอะซิติกต่อไปได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตกรดอะซิติก ได้แก่ *Acetobacter aceti, Acetobacter pasteurianus, Acetobacter peroxidans* และ *Gluconobacter oxydans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกได้สูง และทนกรดได้ดี ในขั้นตอนการผลิตกรดอะซิติกนี้เป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจน แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นแอซิตัลดิไฮด์ (acetaldehyde) โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcoholdehydrogenase) ขั้นตอนที่สอง เป็นการเปลี่ยนแอซิตัลดิไฮด์เป็นกรดอะซิติก โดยเอนไซม์แอซิตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (acetaldehyde dehydrogenase) เอนไซม์ทั้งสองเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีสารชื่อไพโรโลควิโนไลนี (pyrroloquinoline) ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ คือ รับไฮโดรเจนแล้วเกิดการรีดิวซ์ไซโตโครม การขนย้ายอิเล็กตรอนมีผลให้เกิดแรงขับเคลื่อนโปรตอนข้ามเยื่อหุ้มเซลล์และถูกนำไปใช้สังเคราะห์ ATP (สุมณฑา, 2545; สมใจ, 2550) ดังรูปที่ 1 โดยมีกระบวนการผลิตกรดอะซิติก ดังสมการ

$$\underset{\text{ethanol (46g)}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{oxygen (32g)}}{O_2} \longrightarrow \underset{\text{acetic acid (60g)}}{CH_3COOH} + \underset{\text{water (18g)}}{H_2O}$$

Prince of Songkla University Pattani Campus

จากสมการข้างต้น สามารถคำนวณได้ว่า การออกซิไดซ์เอทานอล 1 โมล จะทำให้เกิดกรดอะซิติก 1 โมล หรือจากเอทานอล 1 ลิตร จะได้กรดอะซิติก 1.036 กิโลกรัม และน้ำ 0.313 กิโลกรัม หรือเทียบเท่ากับเอทานอลร้อยละ 1 (v/v) จะให้กรดอะซิติกร้อยละ 1 (w/v) ค่านี้เป็นค่าที่ใช้ในการคำนวณความเป็นกรดของน้ำส้มสายชูและคำนวณประสิทธิผลของการหมัก (สุมณฑา, 2545; สมใจ, 2550) องค์ประกอบหลักของน้ำส้มสายชู ได้แก่ กรดอะซิติก และน้ำ ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกำหนดไว้ว่า ต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม ต่อน้ำส้มสายชู 100 มิลลิลิตร



รูปที่ 1 การออกซิไดซ์เอทานอลโดยเชื้อ *Acetobacter*
ที่มา : Adam (1998)

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตน้ำส้มสายชู

2.2.1 ยีสต์

ยีสต์ คือ ฟังไจ (fungi) ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับรา แต่ยีสต์มีชีวิตอยู่ได้อย่างอิสระ ไม่เป็นเส้นใย แต่เป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลม (spherical) เช่น *Citeromyces* sp. หรือรี (ellipsoidal) หรือ รูปไข่ (oval) เช่น *Saccharomyces* ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในเทคโนโลยีการหมัก เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ อาหารหมัก เครื่องดื่ม สารเคมี ตลอดจนเอนไซม์ที่ใช้ในโรงงาน (จารุวรรณ, 2551) ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิตมีดังนี้ (สาวิตรี, 2549)

1) เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) ได้แก่ เบียร์และเหล้าชนิดต่างๆ
2) ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง (baker's yeasts)
3) ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์ (food and fodder yeasts)
4) แอลกอฮอล์เชื้อเพลิง (fuel alcohol)

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวก facultative anaerobe แต่ยีสต์เจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดี ในขณะที่สภาวะไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะเจริญเติบโตได้ช้า กลไกการหมักของยีสต์จะใช้สารอินทรีย์เป็นสับสเตรท ยีสต์ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ออกซิเจนจะผ่านเข้าสู่ไมโตคอนเดรียและถูกออกซิไดซ์โดยวัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) และกระบวนการลูกโซ่การหายใจ ทั้งนี้นอกจากออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมในกระบวนการลูกโซ่การหายใจแล้วยังทำหน้าที่เป็นสิ่งกระตุ้นต่อการเจริญเติบโต (growth factor) โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับการเกิดไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญเติบโต ส่วนการเขย่าจะเป็นการเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจนอย่างมากทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์เพิ่มขึ้น ขณะที่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไพรูเวท (pyruvate) จะถูกหมักกลายเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังรูปที่ 2

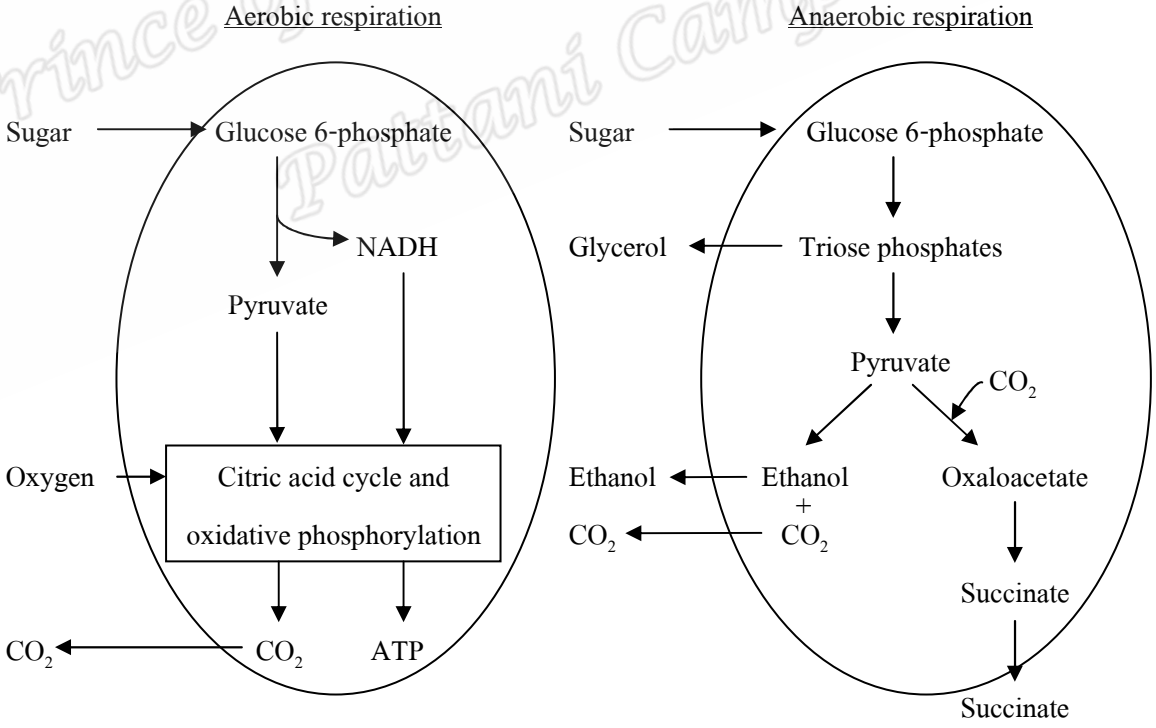
Ciani *et al.* (2000) พบว่า การเจริญเติบโตของยีสต์ *Candida stellata* DBVPG 3827 และ *Saccharomyces cerevisiae* DBVPG 6663 ในสภาวะการหมักที่มีออกซิเจน ยีสต์จะเจริญเติบโตได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ในขณะเดียวกันในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์ *S. cerevisiae* DBVPG 6663 จะผลิตเอทานอลได้สูงกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน (105.9 และ 50.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)

Prince of Songkla University Pattani Campus

Moller *et al*. (2004) พบว่า ในสภาวะที่มีอากาศ ยีสต์ *S. kluyveri* มีผลผลิตมวลเซลล์ 0.29 กรัม คิดเป็นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.49 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีอากาศ มีผลผลิตมวลเซลล์ 0.09 กรัม คิดเป็นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.24 ต่อชั่วโมง

Biswas and Chaffin (2005) พบว่า การเจริญเติบโตยีสต์ *C. albicans* SC 5314 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast nitrogen base (YNB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศ มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 8.1 log CFU/ml ซึ่งสูงกว่าการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีอากาศ มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 7.3 log CFU/ml

Modig *et al*. (2007) พบว่า การเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* CBS 8066 ในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงโดยเติมน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์จะเจริญเติบโตในสภาวะที่มีอากาศได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ผลผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 108 และ 87 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่สภาวะที่มีอากาศยีสต์จะให้ปริมาณเอทานอล 0.36 กรัมต่อกรัม ส่วนสภาวะที่ไม่มีอากาศยีสต์จะให้ปริมาณเอทานอล 0.38 กรัมต่อกรัม ซึ่งในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศและมีแรงดันออสโมติกสูงยีสต์จะเปลี่ยน triose phosphates เป็นกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น จึงทำให้ผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกับสภาวะการหมักแบบมีอากาศ



รูปที่ 2 วิถีการใช้น้ำตาลของยีสต์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน
ที่มา : Walker (1998)

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.2.2. แบคทีเรียกรดอะซิติก

ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกเป็นทรงรี ท่อนตรง หรือโค้งเล็กน้อย มีขนาด 0.6-0.8 ×1.0-4.0 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆหรือเรียงต่อกันเป็นสาย บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ บางชนิดเคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลา (flagella) รอบตัว เป็นเซลล์ที่ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมลบ บางชนิดมีโคโลนีสีชมพู เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน (obligately aerobic) ในกระบวนการหายใจ สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก และถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (overoxidizer) ต่อไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติก มีดังนี้

1) ความเข้มข้นของปริมาณกลูโคส

แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งที่ก่อให้เกิดพลังงาน มีผลต่อการผลิตมวลเซลล์ (biomass) ของจุลินทรีย์หรือการสร้างสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ, 2550) จุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่จะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้เป็นอาหารและแหล่งพลังงาน แต่ความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาลของจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกันไป เช่น จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถใช้น้ำตาลแล็กโทส นอกจากชนิดของแหล่งพลังงานจะมีความสำคัญแล้ว ความเข้มข้นของสารก็มีความสำคัญเช่นกัน ซึ่งจะมีผลต่อแรงดันออสโมติก และปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารทีมีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ยกเว้นในแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีน้ำตาลไม่สูงมากนัก (วิลาวัลย์, 2539; บุษกร, 2550)

Conner and Allgeier (1976) พบว่า *A. aceti* สามารถใช้กลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดยกลูโคสร้อยละ 80 จะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคเนท (gluconate) และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานร้อยละ 20 ตามวิถีเฮกโซไคเนส (hexokinase pathway) ในวัฏจักรเฮกโซสโมโนฟอสเฟต (hexose monophosphate cycle) ส่วนน้ำตาลอื่นๆ เช่น กาแลกโตส ไซโลส อะราบิโนส และไรโบส จะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดที่เกี่ยวข้องได้ แต่น้ำตาลเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติก

Prince of Songkla University Pattani Campus

Kim *et al.* (2005) ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ *Acetobacter* sp. RKY4 ในน้ำลูกพลัมที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก การเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงในน้ำลูกพลัม เชื้อ *Acetobacter* sp. RKY4 จะผลิตกรดอะซิติกในน้ำลูกพลัมได้สูงกว่าการไม่เติมน้ำตาลกลูโคส โดยการเติมน้ำตาลกลูโคส 7.5-15 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด (31.6-33.6 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น (20-30 กรัมต่อลิตร) พบว่าปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ลดลงเล็กน้อย (27.0-29.8 กรัมต่อลิตร)

Gullo *et al.* (2006) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อแบคทีเรียอะซิติกที่แยกจากน้ำส้มสายชูพื้นบ้าน โดยเลี้ยงแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SM broth (ประกอบด้วย ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 และกลูโคสร้อยละ 5) ซึ่งมีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกันอยู่ในช่วงร้อยละ 20–30 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5–10 วัน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสจะทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อลดลง โดยความเข้มข้นของกลูโคส ร้อยละ 25 เชื้อจะมีผลต่อการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2) ชนิดและปริมาณไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการและสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป เช่น แบคทีเรียกลุ่ม autotrophic microorganisms สามารถใช้เกลือของแอมโมเนียหรือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตได้ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม heterotrophic microorganisms ใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆเป็นแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์หลายชนิดไม่สามารถย่อยโปรตีนได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำไนโตรเจนจากโปรตีนไปใช้ได้ ถ้าไม่ได้จุลินทรีย์พวกที่สามารถย่อยได้มาย่อยให้ โปรตีนชนิดหนึ่งอาจจะเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายแตกต่างกัน (บัญญัติ, 2536; วิลาวัลย์, 2539; สุมาลี, 2541;สมใจ, 2550) ไนโตรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 2 แหล่ง (สมใจ, 2550) ได้แก่ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ได้แก่ แอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรต เป็นต้น เกลือแอมโมเนียมที่มีราคาถูกที่สุด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะจะเกิด SO_4^{-2} ขึ้น ในทางตรงกันข้ามแก๊สแอมโมเนียและไนเตรตเมื่อถูกเมแทบอไลท์ ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด จนกระทั่ง NH_4^+ หมด จุลินทรีย์จึงสังเคราะห์เอมไซม์ nitrate reductase และใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชสูงขึ้น และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน

Prince of Songkla University Pattani Campus

หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบางอย่าง ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่จุลินทรีย์เมแทบอไลท์ได้รวดเร็ว อาจทำให้สร้างผลผลิตที่ต้องการได้น้อย

แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนจากอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ เริ่มจากการสังเคราะห์กลูตาเมทโดยเอนไซม์กลูตามิกดีไฮโดรจิเนส (glutamic dehydrogenase) ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียม และ 2-ออกซิกลูตาเรท (2-oxyglutarate) ซึ่งเกิดจากวัฏจักรกรดไตรคาร์-บอกซิลิกได้ กลูตาเมท ส่วนการสังเคราะห์แอล-กลูตาเมท และออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) และคาดว่ากรดอะมิโนอื่นๆ อาจเกิดขึ้นโดยวิธีคล้ายกัน (Rainbow, 1966)

นภษร (2545) ศึกษาผลของปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ *A. aceti* TISTR 102 ในการผลิตน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์-สกัด รำข้าวเจ้า และน้ำมะพร้าว ที่ปริมาณร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 พบว่า ยีสต์สกัด และรำข้าวเจ้าที่ปริมาณต่างกันให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ประมาณร้อยละ 2.1-2.5 ในขณะที่ยีสต์สกัดและรำข้าวเจ้าให้ปริมาณกรดอะซิติกที่สูงกว่าน้ำมะพร้าว (ร้อยละ 1.7-2.3)

Kim *et al.* (2005) ศึกษาผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจนต่อการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ *Acetobacter* sp. RKY4 ในน้ำลูกพลัม พบว่า การเติมแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด และเปปโตน จะให้ปริมาณกรดอะซิติกที่สูงกว่าการเติมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต

3) ค่าพีเอช

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวการสำคัญ และการทำงานของเอนไซม์ถูกควบคุมโดยค่าพีเอช สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันไปในจุลินทรีย์แต่ละชนิด แบคทีเรียส่วนมากเจริญเติบโตได้ดีในพีเอชที่ค่อนข้างเป็นกลางประมาณ 6.5-7.5 ยกเว้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดจะเจริญเติบโตได้ที่ค่าพีเอชต่ำกว่าค่าปกติที่แบคทีเรียอื่นๆเจริญเติบโต เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดอะซิติก เป็นต้น นอกจากค่าพีเอชจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ยังมีผลต่อการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์เยื่อบุเซลล์ (cell membrane) ของจุลินทรีย์ ซึ่งเยื่อบุเซลล์ค่อนข้างจะไม่ยอมให้ H^+ และ OH^- ผ่านมากนัก ความเข้มข้นของสารเหล่านี้ในไซโทพลาสซึมจึงยังคงที่ ถึงแม้สภาพแวดล้อมรอบเซลล์ จะมี H^+ และ OH^- ปริมาณมากก็ตาม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อกรดอะมิโนถูก

Prince of Songkla University Pattani Campus

ดีคาร์บอกซิเลท (decarboxylate) จะทำให้มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการผลิตสารเอมีน (amine) ออกมา โดยปกติเซลล์แบคทีเรียจะมีประจุลบ ในการขนส่งอาหารสารประกอบที่ไม่มีประจุจะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ในขณะที่สารที่มีประจุจะเข้าสู่เซลล์ไม่ได้

ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกอยู่ระหว่าง 5.0-6.5 (Gullo and Giudici, 2008) De Ley and Frateur (1898) พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมแก่การเจริญของ *A. aceti* อยู่ในช่วง 5.4-6.3 ขณะที่การออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกจะเกิดได้ดีที่ค่าพีเอช 4.5 นอกจากนี้แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถเจริญได้ในค่าพีเอชที่ต่ำ โดย Kittelmann *et al.* (1989) อ้างโดย Gullo and Giudici (2008) พบว่า สามารถแยกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกจาก aerated acetate media ที่มีค่าพีเอชที่ 2.0-2.3 อย่างไรก็ตามเมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 3.4 จะทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ ซึ่งจะเป็นสาเหตุให้การรอดชีวิตของ *A. aceti* ลดลงอย่างรวดเร็ว (Joyeux *et al.,* 1984) และค่าพีเอชที่ 7-8 เชื้อ *Acetobacter* sp. จะเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (De Ley and Frateur, 1974)

4) อัตราการให้อากาศต่อการหมัก

ออกซิเจนเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตสารเมแทบอไลท์

Acetobacter sp. เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (obligate aerobes) เนื่องจากไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในขบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน (De Ley and Frateur, 1974) จึงพบว่าการหมักน้ำส้มสายชูที่ไม่มีการให้อากาศระหว่างการหมัก แบคทีเรียกรดอะซิติกจะเจริญอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก ทำให้มองเห็นเป็นแผ่นฟิลม์ (film) และเนื่องจาก *Acetobacter* sp. ต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก ดังนั้นการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย (Conner and Allgeier, 1976; Adams, 1985)

Horiuchi *et al*. (2002) พบว่า เมื่อเพิ่มการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยการเขย่าเพิ่มจาก 130 รอบต่อนาที เป็น 230 รอบต่อนาที จะเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pasteurianus* อย่างมีนัยสำคัญ มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 3.2 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 250 ชั่วโมง เมื่อใช้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที ในขณะที่การเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ในเวลา 500 ชั่วโมง เชื้อ *A. pasteurianus* มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 1.5 กรัมต่อลิตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.3 การผลิตกล้าเชื้อ

2.3.1 กล้าเชื้อ (Starter culture)

กล้าเชื้อ คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการโดยมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมาก ซึ่งอาจจะประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพียง 1 ชนิด (single-strain culture) หรือมากกว่า 1 ชนิด (multiple-strain culture) ก็ได้ โดยการเติมกล้าเชื้อลงในวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารหมักอย่างตั้งใจ กล้าเชื้อจะไปเพิ่มอัตราเร็วในการหมัก ทำให้การหมักมีประสิทธิภาพและเกิดการหมักไปในทางที่ดีตามที่ต้องการ โดยกล้าเชื้ออาจอยู่ในรูปแบบของเหลว ผง ก้อน หรืออัดเม็ด เป็นต้น แต่ส่วนใหญ่นิยมทำเป็นกล้าเชื้อแบบผงเพื่อให้ง่ายต่อการพกพาและการใช้งาน สามารถแบ่งกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักได้ 3 ชนิดตามประเภทของอาหารหมัก (ประมวล, 2551) คือ

1. แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีผลให้เกิดสภาวะกรดในระหว่างการหมัก (acid fermentation) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก เช่น โยเกิร์ต ชีส ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ผักและผลไม้ดอง เป็นต้น
2. ยีสต์ (Yeast) เป็นจุลินทรีย์ที่มีผลให้เกิดแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมัก (alcohol fermentation) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก เช่น ขนมปัง เบียร์ ไวน์ และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์บางชนิด เป็นต้น
3. เชื้อรา (Fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่มีผลให้เกิดสภาวะด่างในระหว่างการหมัก (alkaline fermentation) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก เช่น เทมเป้ ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว เป็นต้น

กล้าเชื้อที่ผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้นมีวิธีการผลิตต่างๆกัน ซึ่งควรมีคุณสมบัติโดยทั่วไป ดังนี้ (นภา, 2534)

1. กล้าเชื้อที่ผลิตต้องอยู่ในรูปแบบที่ใช้ง่ายและเหมาะสมต่อกรรมวิธีการหมักแต่ละชนิด เช่น การหมักบางประเภทจำเป็นต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ปลอดจากจุลินทรีย์อื่นโดยสิ้นเชิง ในขณะที่อาหารหมักอื่นๆอาจไม่มีความจำเป็นเช่นนั้น
2. กล้าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมัก ควรมีอายุการเก็บนานพอสมควร โดยที่มีจุลินทรีย์ที่ยังคงประสิทธิภาพในปริมาณมากพอที่จะดำเนินกิจกรรมการหมัก ดังนั้นการผลิตกล้าเชื้อแต่ละชนิดจึงต้องแน่ใจว่ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากพอ และตรวจสอบปริมาณที่เหลือในช่วงระยะเวลาต่างๆกัน เพื่อกำหนด

Prince of Songkla University Pattani Campus

อายุการใช้งาน นอกจากนั้นกรรมวิธีการผลิตที่ใช้จะต้องคำนึงถึงการลดปริมาณเชื้อบาดเจ็บ (injured cell) ให้ได้มากที่สุด

3. วัสดุที่จะใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ และผสมในกล้าเชื้อต้องไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรส และคุณสมบัติอื่นๆของอาหารหมัก
4. ในกรณีที่กิจกรรมการหมักเกิดจากเชื้อผสม กล้าเชื้อต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสม
5. กล้าเชื้อที่ผลิตขายเป็นอุตสาหกรรม จะต้องอยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการขนส่ง บรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันแมลงได้ดี

2.3.2 การผลิตกล้าเชื้อ

ในการเลี้ยงเชื้อที่นำมาผลิตกล้าเชื้อมีความสำคัญมาก เพราะกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่จะมาทำการเลี้ยงขยายให้ได้ปริมาณมากๆ ต้องมีจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมาก ปราศจากสิ่งปนเปื้อนชนิดต่างๆ เช่น โคลิฟอร์ม ยีสต์หรือรา และต้องมีกิจกรรมภายใต้กระบวนการผลิตการใช้กล้าเชื้อมีการใช้หลายรูปแบบ เช่น เชื้อเดี่ยว เชื้อคู่หรือชนิดเชื้อผสม สาเหตุและความจำเป็นในการผลิตกล้าเชื้อ เกิดมาจากการต่อเชื้อ (subculture) สามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งมีผลทำให้เปลี่ยนคุณลักษณะและสมบัติของกล้าเชื้อได้ ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักส่วนใหญ่นิยมใช้กล้าเชื้อเป็นทางเลือกหนึ่งของการแข่งขันทางการค้าและการตลาด อีกทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสินค้า ทั้งนี้เนื่องจากการใช้กล้าเชื้อสำเร็จรูปในการผลิตผลิตภัณฑ์สำหรับโรงงานนั้นสะดวกสำหรับเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยสูง ทั้งสามารถนำกล้าเชื้อสำเร็จรูปเหล่านั้นมาใช้ได้เลย รวมทั้งสามารถเลือกใช้กล้าเชื้อในรูปแบบต่างๆที่มีวิธีการผลิตได้หลายวิธี ซึ่งควรคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้ (สมบูรณ์, 2539)

1. การรักษาให้จุลินทรีย์รอดชีวิต (maintenance of viability) เซลล์อาจตายไประหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา ทำให้เชื้อสูญหายไปในที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียเชื้อ จึงควรคำนึงถึงวิธีการที่ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดมากที่สุดทั้งขณะทำการผลิต และระหว่างการเก็บรักษา
2. การคัดเลือกทำให้ประชากรเปลี่ยนแปลง (population change through selection) สัดส่วนเซลล์ของประชากรรวมอาจลดลงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการผลิต แต่อาจหมดปัญหา ถ้าเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณมาก อย่างไรก็ตามการลดจำนวนเซลล์รอดชีวิตเป็นผลมาจากการคัดเลือกของประชากรที่ทน

Prince of Songkla University Pattani Campus

มากกว่าและนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของเชื้อนั้น การผลิตกล้าเชื้อที่ดีควรให้มีเซลล์รอดชีวิตมากที่สุด และให้ลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อเริ่มต้นมากที่สุด

3. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic change) เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์ และอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาไม่ให้สูญไป แต่เชื้ออาจกลายพันธุ์หรือสูญเสียพลาสมิด (plasmid) ระหว่างการผลิต การผลิตกล้าเชื้อที่ดีควรหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงนี้
4. ความบริสุทธิ์ (purity) เชื้อที่เก็บควรอยู่ในสภาพบริสุทธิ์ และควรลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้ออื่นขณะทำการผลิตด้วย
5. ค่าใช้จ่ายในการผลิตรวมถึงวัสดุ อุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกอื่นๆ เช่น สถานที่ พลังงาน อุปกรณ์ที่มีราคาสูง

การผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธีตามความแตกต่างของระยะเวลาการเก็บรักษาและลักษณะทางชีววิทยาของจุลินทรีย์นั้นๆ โดยวิธีการผลิตกล้าเชื้อ มีหลายวิธี ดังนี้

1. กล้าเชื้อชนิดเหลว (liquid starter)

การผลิตกล้าเชื้อชนิดเหลวเป็นวิธีการที่มีการใช้อย่างกว้างขวางสำหรับเชื้อที่มีปริมาณน้อย และค่อยๆขยายขนาดเมื่อต้องการใช้ในปริมาณมาก โดยทำการเก็บรักษาหรือผลิตในปริมาณน้อยที่เพียงพอต่อการใช้งานสำหรับการผลิตแต่ละครั้งเท่านั้น การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (stock culture) และถ่ายเชื้อทุกอาทิตย์หรือทุกวัน จะใช้เชื้อร้อยละ 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือใช้เชื้อร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ในช่วงสุดท้ายของการบ่มจะเกิดการตกตะกอนต้องทำให้เย็นทันที และเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อเริ่มต้นที่ได้ต้องนำมากระตุ้นทุก 3 เดือน (ภัทรียา, 2541) ข้อดีของกล้าเชื้อชนิดนี้ คือ สามารถที่จะปรับและตรวจสอบได้ก่อนใช้ทุกครั้ง ให้กลิ่นและรสที่ดีกว่า ส่วนข้อเสียของกล้าเชื้อชนิดนี้ คือ กิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้จะแตกต่างกันเพราะเกิดจากความไม่สม่ำเสมอในระหว่างการขนส่งโดยเฉพาะที่ต้องขนส่งในระยะไกล ดังนั้นจึงต้องมีการฟื้นฟูกิจกรรม (reactivate) ของกล้าเชื้อก่อนที่จะทำการใส่เชื้อลงไปในการผลิตในแต่ละครั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

2. กล้าเชื้อชนิดแห้ง (dried starter)

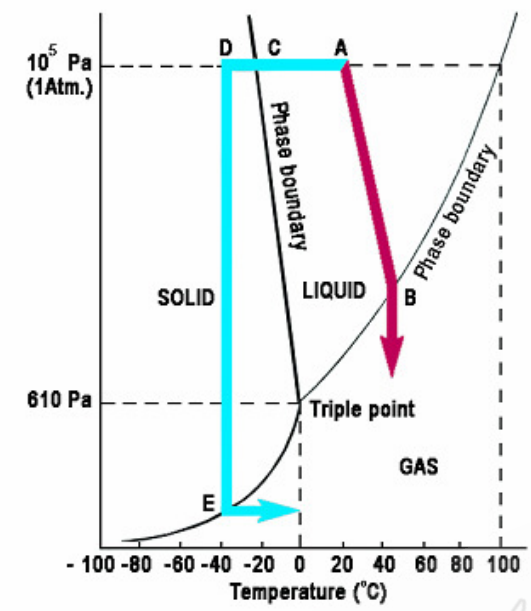
การผลิตกล้าเชื้อโดยวิธีการทำแห้งเป็นวิธีที่ลดการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกล้าเชื้อชนิดเหลว สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อได้นานขึ้น โดยปราศจากการสูญเสียกิจกรรมของเชื้อ และมีความสะดวกในการขนส่ง การทำแห้งเป็นกระบวนการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างเพื่อเปลี่ยนเป็นของแข็งที่อยู่ในสภาพแห้ง กล้าเชื้อชนิดแห้งนี้เป็นกล้าเชื้อชนิดเข้มข้น (concentrate starter) มีเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ร้อยละ 1–2 การนำมาใช้ต้องมีการต่อเชื้อก่อนที่จะนำมาใช้หลายครั้งเพื่อให้เชื้อมีกิจกรรมต่างๆสูงสุด วิธีการทำแห้งมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และการทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นต้น (สมบูรณ์, 2539) โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้รับความนิยมในการผลิตกล้าเชื้อ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิต่ำมีผลให้การรอดชีวิตของกล้าเชื้อเพิ่มขึ้น

2.4 การผลิตกล้าเชื้อโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilized)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) หรือการทำแห้งแบบระเหิด (sublimation drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า “Lyophilization” การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นกระบวนการทำแห้งของของเหลวที่ผ่านการแช่แข็งโดยการระเหิด (sublimation) ส่วนประกอบน้ำจากกล้าเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว การระเหิด คือ การนำน้ำออกจากตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งในสภาวะก๊าซโดยไม่ผ่านสภาวะที่เป็นของเหลว (กฤษณ์, 2535; รุ่งนภา, 2535; สมบูรณ์, 2539; สุพรรณิการ์, 2544; ปัณณธร, 2547)

หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแห้งแบบต่างๆ สามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (phase diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ ดังรูปที่ 3 จุด A ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ (30 องศาเซลเซียส และ 105 Pa) น้ำอยู่ในสถานะของเหลว การทำแห้งโดยทั่วไป (conventional drying) จะให้พลังงานความร้อนกับผลิตภัณฑ์ จนถึงระดับความร้อนแฝงของการระเหยน้ำ (latent heat of evaporation) น้ำภายในผลิตภัณฑ์ระเหยเปลี่ยนสถานะเป็นไอที่จุด B แต่การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็ง C หรือจุด D ซึ่งต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำภายในผลิตภัณฑ์สร้างผลึกเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดความดันสุญญากาศลงจนต่ำกว่าจุด E หรือเส้นขอบเขตของการเปลี่ยนสถานะ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งภายในผลิตภัณฑ์เกิดการระเหิดเปลี่ยนสถานะเป็นไอ และตอนสุดท้ายจึงค่อยๆให้พลังงานความร้อนแฝงของการระเหิด เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อให้น้ำแข็งระเหิดเป็นไอได้อย่างสมบูรณ์ (ปัณณธร, 2547)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 3 แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์
ที่มา : ปัณณธร (2547)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการเก็บรักษาทางชีววิทยา การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีผลทำให้ตัวอย่างนั้นสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานและคืนรูปได้ดี และเป็นวิธีการที่เชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอย ถึงแม้ว่าในกระบวนการแช่แข็งและการทำแห้งสามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย แต่สามารถป้องกันได้โดยการเติมสารปกป้องเซลล์ (protective agent) เช่น อินโนซิทอล ซอร์บิทอล กลูโคส และซูโครส เป็นต้น ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เชื้อที่ใช้ควรอยู่ในระยะการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เนื่องจากเชื้อในช่วงนี้มีการต้านทานต่อการแช่แข็งได้มากกว่าระยะเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) (Cogan and Accolas, 1996)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การแช่เยือกแข็ง การทำ-แห้งระยะที่ 1 และการทำแห้งระยะที่ 2 (ปัณณธร, 2547; Simione and Brown, 1991)

1) การแช่เยือกแข็ง (freezing)

การทำ freezing มีจุดประสงค์ให้ตัวอย่างนั้นมีสภาพเป็นของแข็งโดยใช้ความเย็น สิ่งที่สำคัญของขั้นตอนนี้ คือ วิธีการในการแช่แข็งและอุณหภูมิสุดท้ายของตัวอย่างที่ทำการแช่แข็ง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตัวอย่างที่นำมาผ่านกระบวนการ

Prince of Songkla University Pattani Campus

อยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลวจะถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว (quick freezing) ซึ่งจะเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก ถ้าผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กมากๆจะทำให้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำได้ยาก แต่การทำอันตรายหรือการทำลายต่อตัวอย่างนั้นจะมีผลน้อยที่สุด ในขณะที่การให้ความเย็นในอัตราที่ช้า (natural freezing) จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่ใหญ่ เมื่อน้ำถูกระเหิดออกจากตัวอย่างทำให้เกิดโพรงหรือช่องว่างที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีผลต่อความสามารถคงสภาพของตัวอย่างหรือการมีชีวิตรอดของเชื้อลดลง เนื่องจากผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่จะเบียดช่องว่างระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์แตก ดังนั้นกระบวนการแช่แข็งจึงเกี่ยวข้องอย่างมาก การศึกษาลักษณะของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งจึงเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากขนาดและรูปร่าง (configuration) ของผลึกน้ำแข็งนั้นมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์หรือคุณภาพของตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็ง

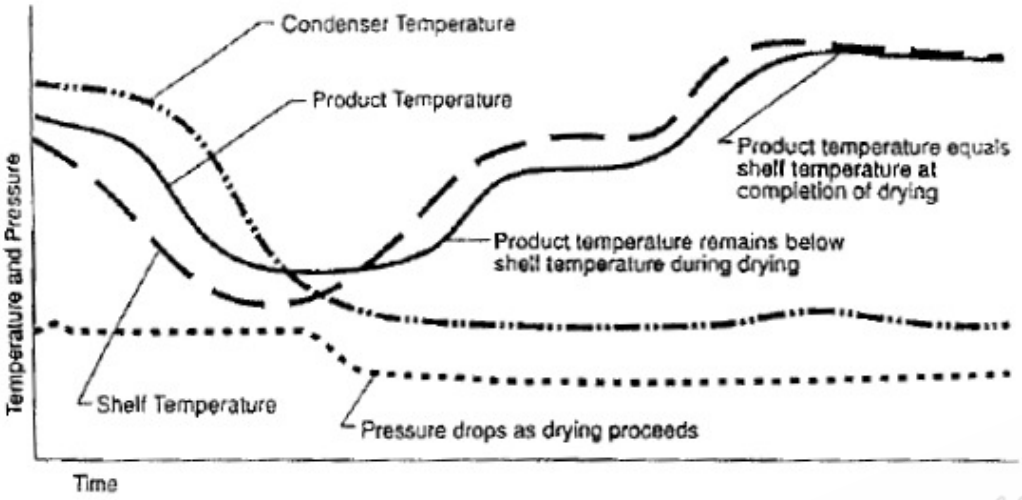
2) การทำแห้งระยะที่ 1 (primary drying)

ขั้นตอนนี้เป็นการลดความดันลง เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ เครื่องปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump) เป็นอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และตัวดักจับความชื้น (moisture trap) ที่เรียกว่า เครื่องควบแน่น (condenser) ซึ่งจะดักจับโมเลกุลของน้ำก่อนที่จะเข้าสู่ปั๊มดูดอากาศ โดยที่เครื่องควบแน่นจะเป็นโลหะที่มีผิวหน้าที่มีความเย็น อุณหภูมิของเครื่องควบแน่นจึงจำเป็นต้องเย็นกว่าอุณหภูมิของตัวอย่าง อัตราการระเหิดนั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความดันไอระหว่างตัวอย่างและเครื่องควบแน่น ความดันไอจะแปรผันไปตามอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิของตัวอย่างสูงก็จะมีความดันไอที่สูงและ primary drying ก็จะเร็ว อุณหภูมิของตัวอย่างในระหว่าง primary drying ต้องมีความสมดุลของอุณหภูมิที่คงสภาพของ solidified frozen suspension และความดันไอที่มีค่าสูงสุด การเกิดการทำความเย็นแบบระเหยน้ำ (evaporative cooling) จะมีความร้อนมาเกี่ยวข้อง ถ้าความร้อนมีมากเกินไปจะทำให้ตัวอย่างนั้นเกิดการหลอมเหลวขึ้นได้ ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแสดงดังรูปที่ 4 ขั้นตอน primary drying นี้ต้องมีเครื่องมือในการตรวจวัดความดันเพื่อที่จะหาจุดยุติของกระบวนการนี้ โดยมีปริมาณความชื้นที่หลงเหลือ (residual) ประมาณร้อยละ 7–8

3) การทำแห้งระยะที่ 2 (secondary drying)

หลังจาก primary drying แล้ว ตัวอย่างนั้นยังคงมีน้ำหลงเหลืออยู่เป็นชนิด bound water สามารถกำจัดออกจากตัวอย่างได้โดยการระเหิด ขั้นตอนนี้จะกระทำภายใต้อุณหภูมิของ condenser ที่ต่ำและความดันต่ำ ปริมาณความชื้นที่หลงเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 1 ในกรณีของจุลินทรีย์บางชนิดจะมีปริมาณความชื้นที่หลงเหลือประมาณร้อยละ 2–3 เพื่อความคงทนของเชื้อจุลินทรีย์

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4 วัฏจักรการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในเครื่องทำแห้งแบบชั้น (shelf dryer)
ที่มา : Simione and Brown (1991)

การสูญเสียชีวิตของเชื้อสามารถเกิดขึ้นในระหว่างการทำแห้งหรือการแช่แข็ง โครงสร้างเซลล์ของจุลินทรีย์ในระหว่างการแช่แข็งจะทำให้สารอิเลคโตรไลท์และสารละลายชนิดอื่นๆที่มีอยู่ภายในเซลล์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น กลไกการเกิดการทำลายเซลล์เป็นผลมาจากการเกิดผลึกน้ำแข็งและปริมาตรที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เซลล์แตก และเมื่อเกิดผลึกน้ำแข็งและความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์จะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำซึ่งเป็นผลทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่างภายในเซลล์และความแรงของไอออน (ionic strength) อาจเป็นสาเหตุในการเพิ่มอัตราการเสียหายจากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้น การเพิ่มความทนทานของเชื้อจุลินทรีย์ต่อกระบวนการแช่แข็งนั้นมีความสัมพันธ์กับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เนื่องจากถ้ามีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะทำให้ต้านทานได้สูง นอกจากนี้โปรตีนบางชนิดที่ผนังเซลล์จะเกิดการสูญเสียสภาพ (denature) ในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ลักษณะพิเศษทั่วไปของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีดังนี้

1) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีมีน้อย เพราะการเสื่อมเสียเนื่องจากความร้อน (สมบูรณ์, 2539)
2) การกลับคืนสู่สภาพก่อนการอบแห้งโดยการเติมน้ำให้กล้าเชื้ออีกครั้งเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้ดีได้ง่าย เนื่องจากการกำจัดส่วนประกอบน้ำในสภาวะเยือกแข็งมีผลให้กล้าเชื้อที่ผ่านการทำแห้งมีรูพรุนจำนวนมาก

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) ต้องใช้เวลายาวนานในการทำแห้ง เนื่องจากการทำแห้งเกิดที่อุณหภูมิต่ำ อัตราการทำแห้งจึงช้ามาก

4) มีต้นทุนสูงเมื่อเทียบกับการทำแห้งวิธีอื่น เนื่องด้วยค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานและค่าใช้จ่ายด้านอุปกรณ์มีมูลค่าสูง

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภัทรียา, 2541) ที่สำคัญมีดังนี้

1) ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (type of organism)

ขนาดและองค์ประกอบของเชื้อจุลินทรีย์นั้นจะมีผลต่อการมีชีวิตรอด สปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีความสามารถในการต้านทานความแห้งจึงมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อผ่านกรรมวิธีการทำแห้ง จุลินทรีย์ชนิดแกรมบวกจะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ เพราะเนื่องจากไขมันที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จะช่วยในการคงสภาพของเซลล์ให้คงอยู่ได้ดีกว่า และเซลล์ที่มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์น้อย เมื่อนำมาแช่แข็งจะต้องลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆเพื่อให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ธรรมชาติของผนังเซลล์เป็นสาเหตุให้การแพร่ของน้ำผ่านเข้าออกเซลล์ได้ยาก จึงจำเป็นต้องให้อัตราการลดอุณหภูมิช้าลงเพื่อให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์ได้

2) อายุของเชื้อจุลินทรีย์ (physiological age)

เซลล์จุลินทรีย์ที่มีอายุอยู่ในช่วงระยะการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จะมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าเชื้อที่อยู่ในช่วงระยะเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์

3) ความเข้มข้นของเซลล์ (cell concentration)

ปริมาณเริ่มต้นของเซลล์มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตโดยที่อัตราการรอดชีวิตจะมีสูงขึ้นเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการแช่แข็งแห้ง และควรมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และภายหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งจะต้องมีเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 10^{8} CFU/ml (Morgan *et al.*, 2006) หรือต้องมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^{9} CFU/g (Sokollek and Hammes, 1997)

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.5 สารปกป้องเซลล์หรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์ (Protective agents) ต่อการผลิตกล้าเชื้อแบบผง

การผลิตกล้าเชื้อแบบผง เชื้อจุลินทรีย์จะต้องผ่านกรรมวิธีในการผลิตที่มีอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้อง เชื้ออาจถูกทำลายโดยอุณหภูมิที่นำมาใช้ ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อลดลง จึงต้องมีการป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับอันตราย โดยมีการเติมสารบางชนิดซึ่งมีผลช่วยให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (ภัทรียา, 2541) สารปกป้องเซลล์หรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์จะป้องกันความร้อนหรือความเย็น (cryoprotectants or protective substances) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้ง ซึ่งจะช่วยลดการถูกทำลายของเซลล์ และช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้ง รวมถึงในการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีจำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเซลล์ที่ได้รับความเสียหายบางส่วน (sub-lethal damage) ซึ่งอาจกลายเป็นเซลล์ตาย (lethal form) ในระหว่างการเก็บรักษา โดยกระบวนการขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำ ออกซิเจน และอุณหภูมิ (Simpson *et al.,* 2005) ไม่เพียงแต่เยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้นที่ไวต่อความร้อนในระหว่างการทำแห้ง แต่ผนังเซลล์ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ยังได้รับผลกระทบจากความร้อนซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียกิจกรรม (metabolic activity) ได้ (Meng *et al.,* 2008) สารประกอบที่นิยมใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ นมพร่องไขมัน น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล โซเดียมกลูตาเมต (sodium glutamate) หรือส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสกับซีรั่ม (serum) เป็นต้น กิจกรรมของสารปกป้องเซลล์จะสัมพันธ์กับโรงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารที่ปกป้องเซลล์ได้ดีต้องมีหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ (hydrogen bond) อยู่ในโมเลกุลสามหมู่หรือมากกว่า และมีหมู่ที่ไอโอโนสได้อยู่ด้วย คือมีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน มีหมู่คาร์บอกซีอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาและแกมม่า และมีส่วนของโมเลกุลระหว่างหมู่แกมม่า คาร์บอกซีและหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์ (polyalcohol) มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ ซึ่งอาจช่วยในการป้องกันเซลล์จากอันตรายได้ นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ สิ่งที่สำคัญอีกประการคือ สารปกป้องเซลล์ต้องสามารถป้องกันเซลล์จากผลทางกายภาพระหว่างที่สภาวะแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือในกระบวนการทำแห้งมีการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ ซึ่งน้ำเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญภายในเซลล์ นอกจากผลของปฏิกิริยาของสารปกป้องเซลล์กับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารปกป้องเซลล์จะทำให้อิเลคโตรไลท์เป็นกลาง ไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกเซลล์เมมแบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญไป และยังสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศ (Hubálek, 2003)

Ndoye *et al.* (2007) ศึกษาการรอดชีวิตของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ *Acetobacter cerevisiae* สายพันธุ์ LMG 1625^{T}, CWBI-B418^{T} และ CWBI-B419^{T} ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานความร้อน ผลิตกล้าเชื้อโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยนำเซลล์จุลินทรีย์แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 23 ชั่วโมง โดยใช้แมนนิทอล (mannitol) ร้อยละ 20 (w/w) เป็นสารปกป้องเซลล์ พบว่ากล้าเชื้อ *A. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้สารป้องกันเซลล์มีปริมาณมวลเซลล์ (biomass cell) มากกว่า 1×10^{10} CFU/g และเก็บรักษากล้าเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้การบรรจุแบบสุญญากาศ เพื่อป้องกันจากความชื้น ออกซิเจน และแสง เป็นเวลา 6 เดือน จะมีการรอดชีวิตสูงกว่ากล้าเชื้อที่ไม่ใช้สารปกป้องเซลล์ แสดงว่าการใช้สารปกป้องเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีผลต่อการมีชีวิตของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ความคงตัวของกล้าเชื้อที่ไม่ได้ใช้สารปกป้องเซลล์มีการลดลงอย่างรวดเร็วประมาณร้อยละ 10 ($<1\times10^{5}$ CFU/g) เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน โดยสารปกป้องเซลล์จะรักษาการเหลือรอดของจุลินทรีย์ได้เกือบร้อยละ 50 หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน นอกจากนี้สามารถเก็บรักษากล้าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 9 เดือน เมื่อใช้แมนนิทอลร้อยละ 20 (w/w) เป็นสารปกป้องเซลล์

2.6 การผลิตกล้าเชื้อโดยการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ

การผลิตกล้าเชื้อโดยใช้วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งหรือการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ใช้ทางการค้า มีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่สูง แต่ในขณะเดียวกันการทำแห้งโดยใช้ความร้อนไม่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้รับความเสียหายระหว่างกระบวนการทำแห้ง และจากการใช้อุณหภูมิสูงในการทำแห้ง การทำแห้งโดยใช้ความร้อน (drying) เป็นการให้ความร้อนแก่ตัวอย่าง เพื่อกำจัดน้ำโดยการลดปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_w) หรือความชื้นให้เหลือประมาณร้อยละ 2-3 ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ (รุ่งนภา, 2535; วิไล, 2546) การทำแห้งโดยใช้ความร้อนในการผลิตกล้าเชื้อ เช่น การตากแดด (sun drying) ตู้อบแห้งโดยใช้ลมร้อน (hot air drier) เป็นต้น

นภา และคณะ (2530) ศึกษาการผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชูโดยใช้เชื้อ *Acetobacter* sp. 249-1 ซึ่งได้คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตกรด ทนอุณหภูมิสูง และมีชีวิตอยู่รอดนานจากการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพร 29 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้เตรียมลูกแป้งและจุลินทรีย์ที่มักพบในอาหาร พบว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตลูกแป้งคือ ลูกแป้งที่ปั้นโดยใช้

Prince of Songkla University Pattani Campus

เชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/g ต่อแป้ง 100 กรัม และน้ำมะพร้าว 80-85 มิลลิลิตรผสมสมุนไพร ได้แก่ พริกไทยขาวและดอกจันทร์อย่างละ ร้อยละ 3 และลูกจันทร์ร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพดี และเก็บไว้ได้นานที่สุด ส่วนการทำแห้งโดยการตากแดดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อลดลงประมาณ 1 log cycle ลูกแป้งที่เตรียมได้จะคงประสิทธิภาพเป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน เมื่อเก็บในตู้เย็น และเมื่อใช้ลูกแป้งปริมาณร้อยละ 8 จะหมักได้น้ำส้มสายชูที่มีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 6-7

รสสุคนธ์ และนภา (2532) ทดสอบการเจริญของ *Acetobacter* sp. 249-1 ในสภาวะที่มีสารกันเสีย และการผลิตน้ำส้มสายชูในรูปเชื้อผง พบว่า การผลิตโดยบรรจุรำละเอียด 10 กรัม ลงในถุงพลาสติกชนิดทนร้อนในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ แล้วเติมน้ำมะพร้าวที่ปราศจากเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 1 และกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. 249-1 ปริมาณ 10^3 เซลล์ต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการลดความชื้นโดยการเติมรำละเอียดที่ปราศจากเชื้อผสมกรดโปรปิโอนิกจนได้ความเข้มข้นร้อยละ 2 ของส่วนผสม เชื้อผงที่ผลิตได้จะมีความชื้นร้อยละ 17-19 และเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณเซลล์จะลดลงเพียงประมาณ 1 log cycle การเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เชื้อจะลดลงประมาณ 2 log cycle ส่วนเชื้อผงที่ผลิตจากแป้งข้าวเจ้าสามารถเก็บในอุณหภูมิห้องได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นต่ำ

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในการผลิตกล้าเชื้อ โดยมีข้อดี คือ มีค่าใช้จ่ายด้านพลังงานต่ำกว่าวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็งและการทำแห้งแบบพ่นฝอย สามารถลดการสูญเสียเซลล์จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตได้ และให้ประสิทธิภาพการหมักของกล้าเชื้อสูงกว่ากล้าเชื้อที่ผลิตด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็งและการทำแห้งแบบพ่นฝอย จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์กระบวนการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำในการผลิตกล้าเชื้อแบบผง

Tsaousi *et al.* (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า สามารถกำจัดความชื้นได้ร้อยละ 90 และเมื่อนำกล้าเชื้อที่ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักกับกล้าเชื้อจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเซลล์เปียก (wet cell) พบว่า กล้าเชื้อจากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำและเซลล์สดมีกิจกรรมการหมัก เช่น เวลาในการหมักใกล้เคียงกัน ส่วนกล้าเชื้อจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะใช้เวลาการหมักสูงกว่ากล้าเชื้อจากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้พบว่า ระยะเวลาในการเก็บรักษากล้าเชื้อที่เก็บรักษาภายใต้การบรรจุแบบปราศจากบรรยากาศแก๊สเฉื่อย เป็นเวลา 1 เดือน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae*

Prince of Songkla University Pattani Campus

Dimitrellou *et al.* (2008) ศึกษาการรอดชีวิตของกล้าเชื้อคีเฟอร์ที่ผ่านการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ ได้แก่ 28, 33 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่า กล้าเชื้อคีเฟอร์จากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ ทั้งแบบให้อากาศหมุนเวียนและไม่ให้อากาศหมุนเวียน ปริมาณความชื้นจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไป 20 ชั่วโมง โดยการให้อากาศหมุนเวียนในระหว่างกระบวนการทำแห้งกล้าเชื้อจะมีปริมาณความชื้นที่สูงกว่าการไม่ให้อากาศหมุนเวียน การรอดชีวิตของกล้าเชื้อคีเฟอร์ที่ผ่านการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำร่วมกับการให้อากาศหมุนเวียน พบว่า เชื้อ *Lactobacillus*, *Lactococci* และยีสต์ มีการรอดชีวิตที่ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่การไม่ให้อากาศหมุนเวียน เชื้อ *Lactobacillus*, *Lactococci* และยีสต์ จะมีการรอดชีวิตสูงเมื่อใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงจะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่สูงในองค์ประกอบของโปรตีน ส่วนการเก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิ 4–6 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 7, 15, 30 และ 365 วัน พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* ในกล้าเชื้อคีเฟอร์ที่มีการเติม เคซีนเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเซลล์จะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่ากล้าเชื้อคีเฟอร์ที่ไม่มีการเติมเคซีน ขณะที่เชื้อยีสต์จะมีการรอดชีวิตในกล้าเชื้อคีเฟอร์ที่ไม่มีการเติม เคซีนสูงกว่าคีเฟอร์ที่มีการเติมเคซีน อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษากล้าเชื้อคีเฟอร์เป็นเวลา 365 วัน ทั้งที่มีการเติมเคซีนและไม่มีการเติมเคซีนเป็นสารปกป้องเซลล์ยังมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อเมื่อระยะการเก็บเพิ่มขึ้น และกล้าเชื้อคีเฟอร์ที่ไม่มีการเติมเคซีนเมื่อนำมาหมัก พบว่า มีระยะเวลาในการหมักที่เร็วกว่ากล้าเชื้อคีเฟอร์ที่มีการเติมเคซีน

Prince of Songkla University Pattani Campus