การศึกษาผลของชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีไลโอฟิไลซ์

(Effect of kinds of cryoprotectant in lyophilization on viability of bacterial cultures)

นางสาวลลิตา อุปสัน

นางสาวเลอสิริ ก้องเกียรติวงศ์

นางสาววาสนา หมื่นอักษร

รายงานปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21699

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

T097116

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาผลของชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีไลโอฟิไลซ์

Effect of kinds of cryoprotectant in lyophilization on viability of bacterial cultures

อน.
ว145ก
2549

สขหมู่.....
สขทะเบียน.....97116
วัน,เดือน,ปี.....- 5 JUN 2006

b.....41228131
ก.....

จัดทำโดย

นางสาวลลิตา	อุปสัน	รหัสนักศึกษา	46041069
นางสาวเลอสิริ	ก้องเกียรติวงศ์	รหัสนักศึกษา	46041070
นางสาววาสนา	หมื่นอักษร	รหัสนักศึกษา	46041071

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..../..../.... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลลิตา อุปสัน, เลอสิริ ก้องเกียรติวงศ์ และ วาสนา หมื่นอักษร. 2549 : การศึกษาผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีไลโอฟิไลซ์ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง : 65 หน้า

บทคัดย่อ

การใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดมากขึ้น ซึ่งสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยวิธีนี้คือ สคิมมิลค์ จากการศึกษาของเกรียงไกรและคณะ (2548) โดยใช้สคิมมิลค์ในการเก็บรักษาแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 12 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter aceti* AIKL 1001, *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013, *Escherichia coli* AIKL 1014, *Escherichia coli* AIKL 1015, *Proteus vulgalis* AIKL 1019, *Salmonella cerro* AIKL 1023, *Salmonella lexington* AIKL 1027, *Salmonella wandawort* AIKL 1031, *Staphylococcus aureus* AIKL 1034 และ *Staphylococcus aureus* AIKL 1039 เมื่อใช้สคิมมิลค์ แล้วอัตราการรอดชีวิตหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ±2 °ซ) มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ จึงทำการศึกษาสารไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ของแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยทำการเปรียบเทียบผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ 4 ชนิด คือ สคิมมิลค์, ซูโครส, ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และทรีฮาโลสแล้ว ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น พบว่า สคิมมิลค์ เหมาะสมสำหรับ *A. aceti* AIKL 1001, *E. coli* AIKL 1014, *E. coli* AIKL 1015, *Pseudomonas* sp. AIKL 1020, *S. agona* AIKL 1021, *S. wandawort* AIKL 1031, *Stap. aureus* AIKL 1034 และ *S. aureus* AIKL 1039 ซูโครส เหมาะสมกับ *C. glutamicum* AIKL 1013 ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน *S. lexington* AIKL 1027 ทรีฮาโลส เหมาะสมกับ *P. vulgalis* AIKL 1019 และ *S. cerro* AIKL 1023 และเมื่อคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของแบคทีเรียที่สารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมพบว่าจะสามารถเก็บรักษาให้มีชีวิตรอดได้ประมาณ 7-10 ปี

ลลิตา อุปสัน		
เลอสิริ ก้องเกียรติวงศ์		
วาสนา หมื่นอักษร		28 ม.ค. 2550
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้ความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ที่ปรึกษาคือ อาจารย์บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ที่สละเวลาดูแลให้คำปรึกษาแนะนำต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ตลอดจนขอขอบคุณ อาจารย์ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหมีด ที่ช่วยแนะนำปรับปรุงแก้ไขโครงร่างปัญหาพิเศษ ซึ่งคณะผู้จัดทำขอบกราบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ทุกท่านที่คอยสนับสนุนเรื่องการเงิน และคอยเป็นกำลังใจให้ ขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะพี่ตาล ที่คอยให้คำแนะนำในการทำแลป ขอบคุณเพื่อนที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเหลือรวมทั้งคอยอยู่เป็นเพื่อนในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ

25 มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์	2
2.2 การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์	4
2.3 เครื่องไลโอฟิไลซ์	7
2.4 ไครโอโปรเทคแทนต์	9
2.5 ชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ใช้ในการทดลอง	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	28
3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	29
3.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและอุปกรณ์ในการทดลอง	29
3.4 การทำไลโอฟิไลซ์	31
3.5 การตรวจหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิต	32
3.6 วิธีการทดลอง	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	35
4.1 ผลของไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น	35
4.2 การคาดคะเนอายุการเก็บรักษาแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม	46
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บรรณานุกรม 50

ภาคผนวก

ก1. จำนวนแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน 52

ก2. ผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ 55

ก3. อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน 56

ข. ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา 57

ค. ภาพแสดงการทำไลโอฟิไลซ์ 60

ประวัติผู้แต่ง 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารไครโอโปรแทคแทนต์ที่ใช้กับจุลินทรีย์	13
2.2	ความบ่อยในการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์	24
3.1	สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	29
4.1	เชื้อแบคทีเรียและไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีไลโอฟีไลซ์	45
4.2	อายุการเก็บรักษาแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟีไลซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม	47
ก1.	จำนวนแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการไลโอฟีไลซ์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน	52
ก2.	ผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟีไลซ์	55
ก3.	อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟีไลซ์โดยใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การเกิดการแช่แข็งในเฟสไดอะแกรมของน้ำ	6
2.2	ส่วนประกอบของการเครื่องแช่แข็งและผลิตภัณฑ์จากการแช่แข็ง	8
2.3	กลไกการทำงานของทรีฮาโลส	26
4.1	การรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ	36
4.2	การรอดชีวิตของ *Acetobacter aceti* AIKL 1001 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	37
4.3	การรอดชีวิตของ *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	38
4.4	การรอดชีวิตของ *Escherichia coli* AIKL 1014 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	38
4.5	การรอดชีวิตของ *Escherichia coli* AIKL 1015 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	39
4.6	การรอดชีวิตของ *Proteus vulgalis* AIKL 1019 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	39
4.7	การรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. AIKL 1020 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	40
4.8	การรอดชีวิตของ *Salmonella agona* AIKL 1021 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	41
4.9	การรอดชีวิตของ *Salmonella cerro* AIKL 1023 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	41
4.10	การรอดชีวิตของ *Salmonella lexington* AIKL 1027 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	42
4.11	การรอดชีวิตของ *Salmonella wandawort* AIKL 1031 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	43
4.12	การรอดชีวิตของ *Staphylococcus aureus* AIKL 1034 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่		หน้า
4.13	การรอดชีวิตของ *Staphylococcus aureus* AIKL 1039 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด	44
4.14	การคาดคะเนอายุการเก็บรักษา *Pseudomonas* sp. AIKL 1020	46
ข.	ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา	57
ค1.	เครื่องไลโอฟิไลซ์	61
ค2.	การถ่ายเชื้อ	62
ค3.	การแช่เย็นเชื้อโดยใช้แอกอฮอล์	62
ค4.	การเสียบหลอดแอมพูลกับเครื่องไลโอฟิไลซ์	62
ค5.	การดอดหลอด	63
ค6.	การเชื่อมปิดหลอด	64
ค7.	หลอดแอมพูลที่ทำการปิดปลายหลอดแล้ว	65
ค8.	การตัดหลอดแอมพูล	65
ค9.	หลอดแอมพูลที่ถูกตัดแล้ว	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีชีวิตรอดเป็นเวลานาน โดยไม่ต้องต่อเชื้อบ่อยๆ ซึ่งอาจทำให้เชื้อตาย เกิดการปนเปื้อน สลับเชื้อ และมีโอกาสกลายพันธุ์ การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องแช่แข็งเซลล์แบคทีเรียในสารละลายตัวกลางที่มีสมบัติเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ (cryoprotectant) คือ สารที่สามารถป้องกันเซลล์ที่ถูกทำให้เสียหายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยสารพวกนี้สามารถละลายน้ำได้ดี มีคุณสมบัติชะลอการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และลดการบาดเจ็บของแบคทีเรียเนื่องจากแรงดันออสโมซิสในระหว่างการแช่แข็งและการละลายของน้ำแข็งภายในเซลล์ มักจะใช้สคิมมิลค์ (skimmed milk) หรือทรีฮาโลส (trehalose) ผสมกับเด็กซ์แทรน (dextran) หรือซูโครสผสมกับโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) และยังมีผลการทดลองของ David (2004) แสดงให้เห็นว่าการใช้ไกลซีนเบตาอีน (glycine betaine) เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์นั้นให้ผลดี แต่สารเหล่านี้ไม่สามารถใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมกับแบคทีเรียทุกชนิด จากผลการวิจัยเกี่ยวกับการเก็บรักษาแบคทีเรียในโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตรของเกรียงไกรและคณะ(2548) ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์โดยใช้สคิมมิลค์พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ จึงได้มีการศึกษาหาไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาโดยวิธีไลโอฟิไลซ์

2. คาดคะเนอายุการเก็บของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

การเก็บรักษาจุลินทรีย์มีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้นานโดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์มีหลายวิธี แต่มีหลักการสำคัญคือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อยังมีชีวิตรอดอยู่มากที่สุด คงลักษณะเดิมมากที่สุด และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม

วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยทั่วไปมี 4 วิธี คือ

2.1.1 การต่อเชื้อหรือการเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและบ่มไว้ในสภาพที่เหมาะสม เมื่อถึงเวลาที่อาหารหมดจึงต่อเชื้อลงในอาหารใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อยไป จุลินทรีย์จึงมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไป วิธีนี้มีข้อดี คือ ทำง่ายไม่ต้องอาศัยความชำนาญพิเศษ และอุปกรณ์ราคาถูกไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน สามารถใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ทั่วไป แต่มีข้อเสีย เช่น ต้องใช้เวลาและแรงงานมากในการเตรียมอาหารและการเพาะเชื้อ ถ้ามีเชื้อจำนวนมากและต้องใช้พื้นที่มากในการเก็บหลอดเชื้อ ในขณะต่อเชื้อลงในอาหารใหม่อาจเกิดการปนเปื้อน (contaminate) จากเชื้ออื่น และเชื้ออื่นเจริญมากขึ้นจนทำให้เชื้อที่เก็บรักษาไว้ตายได้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดความผิดพลาดในการเขียนรหัสเชื้อทำให้สับเปลี่ยนสายพันธุ์กัน รวมทั้งการต่อเชื้อลงในอาหารใหม่เรื่อยๆ อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์และเปลี่ยนลักษณะเชื้อไป

2.1.2 การทำให้แห้ง (drying) โดยดึงน้ำออกและป้องกันไม่ให้เกิดความชื้นอีก เป็นการหยุดการเจริญของเชื้อ ส่วนใหญ่ใช้เก็บเชื้อราซึ่งทนต่อความแห้งได้ดี นอกจากนี้ยังใช้ได้กับยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด การทำให้แห้งในวัสดุต่างๆ ได้แก่ ดิน ทราย ซิลิกาเจล เหมาะสำหรับใช้เก็บเชื้อรา หรือแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ การเก็บบนแผ่นกระดาษ (paper disc) ใช้กับเชื้อยีสต์บางชนิดและ Staphylococci หลังจากทำให้เชื้อและวัสดุแห้งแล้ว จึงเก็บในห่อฟอยล์ภายในภาชนะปิดไม่ให้อากาศเข้า การเก็บบนแท่งวัตถุแห้ง (predried plug) เช่น แป้ง เพปโตน (peptone) หรือเด็กซ์แทรน (dextran) ซึ่งจะดูดซับซัสเพนชันเชื้อไว้ แล้วจึงนำไปทำให้แข็ง และเก็บภายใต้สุญญากาศ วิธีนี้ใช้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีกับเชื้อที่บอบบาง เช่น เชื้อโกโนเรีย และเชื้ออหิวาห์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการเก็บบนแผ่นเจลาติน (gelatin disc) โดยผสมเชื้อในอาหารเจลาตินเหลว นำไปหยดบนจานเลี้ยงเชื้อ และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ หรือทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อแผ่นเจลาตินดิสก์แห้งแล้ว จึงเก็บในหลอดที่ปลอดเชื้อ เมื่อต้องการใช้สามารถนำมาใช้ได้ทีละแผ่นโดยหย่อนลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์นั้นๆ

2.1.3. การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization) เป็นการทำให้น้ำระเหยไปจากซัสเพนชันเชื้อที่เยือกแข็งแล้ว โดยนำจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารวุ้นมาผสมกับสารอาหารแขวนลอย (suspending medium) เช่น สกิมมิลค์ (skimmed milk) หรือกลูโคสซีรับ (glucose syrup) แล้วนำไปเข้าเครื่องทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะถูกดึงออกโดยการระเหิด จุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพแห้งและแข็ง แต่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นานมากกว่า 10 ปี

ข้อดีของวิธีนี้ คือ เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมากและเก็บรักษาได้นาน ส่วนข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการซื้ออุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1.4. การเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (freezing) เป็นการทำให้น้ำในเซลล์กลายเป็นน้ำแข็ง โดยการลดอุณหภูมิ การทำให้เซลล์อยู่ในสภาพแข็งตัวเช่นนี้ มีหลายวิธี ได้แก่ การเก็บบนเม็ดแก้ว (glass bead) ที่ –70 °ซ โดยผสมเชื้อด้วยอาหารเหลวและกลีเซอรอลให้เป็นซัสเพนชัน หยดซัสเพนชันเชื้อบนเม็ดแก้ว แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –70 °ซ เวลาจะใช้จึงดักเม็ดแก้วมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกวิธีหนึ่ง คือ การเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °ซ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้นและเติมกลีเซอรอลหรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide DMSO) เพื่อป้องกันเซลล์แตก แล้วถ่ายใส่หลอดเล็กๆ ปิดฝาให้สนิท นำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิ เพื่อให้อุณหภูมิลดลงมาถึงจุดเยือกแข็งในระดับ –20 °ซ ถึง –30 °ซ แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ –196 °ซ

อย่างไรก็ตาม ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ไม่มีวิธีใดวิธีเดียวที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ทุกชนิด การเก็บรักษาจุลินทรีย์ จึงควรคำนึงถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเก็บ วัตถุประสงค์ในการเก็บ ความพร้อมของเครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งบุคลากรที่มีความชำนาญ และสิ่งสำคัญ คือ งบประมาณที่ใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยมีหลักต้องคำนึงพื้นฐานดังนี้

2.1.4.1 การรักษาให้จุลินทรีย์รอดชีวิต (maintenance of viability) เซลล์อาจตายในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ทำให้สูญหายไปในที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียเชื้อจึงควรคำนึงถึงวิธีการเก็บรักษาที่ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดมากที่สุด ทั้งที่ทำการเก็บและระหว่างการเก็บ

2.1.4.2 การคัดเลือกทำให้ประชากรเปลี่ยนแปลง (population change through selection) สัดส่วนของประชาการอาจลดลงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการเก็บรักษาแต่อาจหมดปัญหาถ้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้นมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเป็นผลมาจากการคัดเลือกประชากรที่ทนทานกว่าและนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของเชื้อนั้น การเก็บรักษาที่ดีควรให้เซลล์มีชีวิตรอดมากที่สุด

2.1.4.3 การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic change) เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาไม่ให้สูญพันธุ์หรือเสียพลาสมิด (plasmid) ระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการเก็บรักษาที่ดีควรลดการเปลี่ยนแปลงนี้

2.1.4.4 ความบริสุทธิ์ (purlity) เชื้อที่ทำการเก็บรักษาควรอยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์และควรลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างทำการเก็บรักษา

2.1.4.5 ค่าใช้จ่าย (expense) ค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเชื้อรวมถึงค่าจ้างผู้ร่วมงาน วัสดุอุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกอื่น เช่น สถานที่และพลังงาน อุปกรณ์ที่มีราคาสูง เช่น เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง

2.1.4.6 จำนวนเชื้อ (number of cultures) สิ่งที่สำคัญที่ควรพิจารณาสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อและวิธีการเก็บรักษา คือ ระยะเวลาในการดำเนินในช่วงต่อมา ศูนย์การเก็บรักษาเชื้อที่มีขนาดเล็กที่ใช้วิธีการเหมาะสมมีภาระมากเมื่อเก็บเชื้อจำนวนมากขึ้น การเลือกวิธีการเก็บได้จำนวนมากอาจมีผลต่อสถานที่เก็บรักษา

2.1.4.7 คุณค่าของเชื้อ (value of cultures) ควรเก็บรักษาเชื้อที่มีความสำคัญโดยไม่เสี่ยงต่อการสูญเสีย และการเก็บรักษาเชื้อที่มีความสำคัญน้อยก็ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่าย

2.1.4.8 การบริการและการขนส่ง (supply and transportation of cultures) ถ้าต้องการส่งเชื้อให้ผู้อื่น จำเป็นต้องมีเชื้ออย่างน้อยสองชุด จึงอาจเตรียมเชื้อไว้เป็นจำนวนมากเพื่อใช้ส่งไปยังแหล่งอื่นๆ ความสะดวกในการส่งขึ้นกับวิธีการเก็บรักษาและจำนวนเชื้อที่ต้องการจะส่ง การส่งเชื้อทางไปรษณีย์ต้องห่อเชื้อให้เหมาะสมและเชื้อต้องรอดชีวิตขณะเสียเวลาและสภาวะอื่นๆ รวมทั้งต้องทราบข้อบังคับของการส่งเชื้อทางไปรษณีย์ทั้งในประเทศและนอกประเทศ

2.1.4.9 ความถี่ของการใช้เชื้อ (frequency of use cultures) เชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ การผลิตทางอุตสาหกรรมหรือการควบคุมคุณภาพอาจต้องใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการ จึงควรคำนึงถึงความสะดวกในการเลี้ยงและเสี่ยงต่อการปนเปื้อน

2.2 การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

ไลโอฟิไลเซชัน (lyophilization) คือกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยการดึงน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ขณะที่อยู่ในสภาพเยือกแข็ง ภายใต้สภาวะที่เป็นสุญญากาศ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลโอฟิไลเซชัน อาจเรียกได้ว่า กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying) ในทางชีววิทยา ซึ่งเป็นพวกวัตถุดิบที่มีความบอบบาง สูญเสียกิจกรรม และปฏิกิริยาเคมีได้เมื่อโดนความร้อน

Lyophilize ได้รากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ "made sovent loving"

การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ (lyophilization or freeze drying) มีกระบวนการ 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.2.1 การเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (freezing) เป็นการทำให้ตัวอย่างเยือกแข็ง คือ น้ำที่มีอยู่กลายเป็นน้ำแข็ง ตามความจริงจะมีน้ำยึดแน่นอยู่กับของแข็ง เช่น ยึดเป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซึ่งน้ำนี้อาจไม่แข็งตัว การเยือกแข็งกระทำได้ในอ่าง (shelling bath) ที่มีแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน ทำให้อุณหภูมิต่ำประมาณ –40 °ซ โดยเครื่องทำความเย็นหรือใช้น้ำแข็งแห้งละลายในแอลกอฮอล์ อุณหภูมิประมาณ –70 °ซ หรือในไนโตรเจนเหลว และทำเยือกแข็งได้ในอุณหภูมิต่ำ (deep freezer) อุปกรณ์ที่กล่าวนี้ไม่รวมเครื่องทำแห้ง แต่เครื่องบางชนิดทำเยือกแข็งได้ด้วย การจะเลือกใช้เครื่องมือใดจึงขึ้นอยู่กับค่าใช้จ่าย และความสะดวกในการเยือกแข็งต้องสมบูรณ์ก่อนเริ่มขั้นตอนต่อไป

การเยือกแข็งตัวอย่างเกิดผลต่อตัวอย่างสามประการ คือ

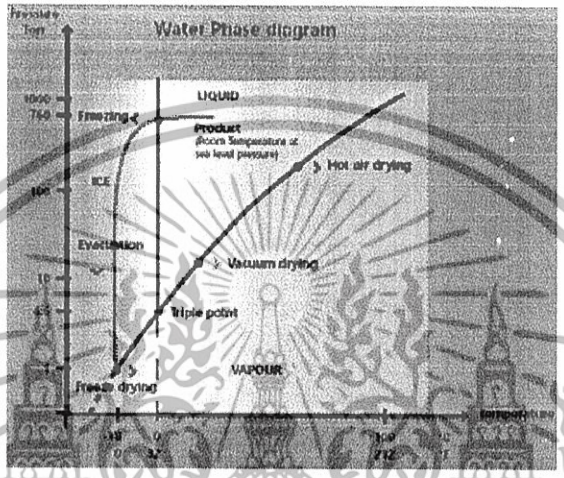
2.2.1.1 ตัวอย่างถูกขจัดน้ำออกบางส่วน (partial dehydration) ของแข็งบางชนิดที่ยังมีน้ำอยู่จะเข้มข้นมากขึ้นจึงต้องรักษาอุณหภูมิให้ต่ำพอเพื่อให้ตัวอย่างเยือกแข็งตลอดกระบวนการ นอกจากนี้ชนิดของวัสดุและอุณหภูมิของตัวอย่างก็มีผลด้วย พวกการเกิดผลึกแก้ว (glass–formers) จะยังคงมีส่วนที่ไม่เยือกแข็ง

2.2.1.2 ความแข็งตึงของโครงร่างของตัวอย่าง (stiffening of structure) ขึ้นอยู่กับส่วนผสมของการเยือกแข็งของน้ำและส่วนที่ไม่เยือกแข็ง (concentrated solution) ซึ่งสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ความแข็งตึงของวัสดุส่วนที่ไม่เยือกแข็ง (ของแข็งที่ยึดกับน้ำที่ไม่เยือกแข็ง) ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารรวมทั้งอุณหภูมิและน้ำที่ประกอบอยู่

2.2.1.3 สัณฐานวิทยาของตัวอย่าง (sample morphology) ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง ทั้งขนาดตำแหน่งและทิศทางของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น จะมีผลต่อการทำแห้ง สัณฐานวิทยาของตัวอย่างจึงขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่าง เช่น ความเข้มข้น ความหนืด การมีผนังเซลล์เมมเบรน รวมทั้งภาวะการขนส่งความร้อน การเยือกแข็งอย่างช้าๆ จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเรียงตัวมีทิศทาง แต่การเยือกแข็งอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งไม่เรียงอยู่ในทิศทางเดียวกันและอาจเป็นผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์ด้วย ตัวอย่างที่หนืดจะเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กไม่เป็นระเบียบ ทำให้ต้านทานการขนส่งมวลระหว่างขั้นตอนการระเหิด (sublimation) จึงทำให้แห้งช้าและโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ตัวอย่างที่เข้มข้นควรทำให้เจือจาง เพื่อให้เกิดการเยือกแข็ง ดังนั้น เราควรจะทำให้ตัวอย่างเยือกแข็งให้เร็วที่สุดเพื่อที่จะได้ผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กและลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ของอาหาร ซึ่งจะไม่ทำลายคุณลักษณะและคุณภาพของตัวอย่าง แต่จะมีการใช้การแช่เยือกแข็งแบบช้ากับอาหารเหลวทำให้เกิดโครงตาข่ายของผลึกน้ำแข็งเพื่อเป็นช่องให้ไอน้ำเคลื่อนที่ได้



ภาพที่ 2.1 การเกิดการแช่แข็งในเฟสไดอะแกรมของน้ำ
ที่มา : http://www.thaiscience.com/lab_vol/p30/freeze%20dryer.asp

2.2.2 การระเหิด (sublimation) คือ การกลายเป็นไอของน้ำแข็ง โดยไม่ผ่านสภาวะของเหลว การระเหิดไม่เกี่ยวข้องกับน้ำที่ไม่แข็งตัว (unfrozen water) ที่ยึดติดอยู่กับของแข็ง ผลึกน้ำแข็งต้องการพลังงาน คือ ความร้อนในการเปลี่ยนเป็นไอ ไอน้ำจะถูกนำออกไปโดยการขนส่งมวล (mass transport) ซึ่งมีปั๊มดูดอากาศช่วยนำออก การระเหิดเกิดขึ้นที่ผิวของตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง ตัวอย่างบางส่วนจะแห้ง (dry layer) และเหลือส่วนที่เยือกแข็ง (frozen layer) ระหว่างชั้นทั้งสอง เรียกว่า อินเตอร์เฟซ (interface) การระเหิดจะดำเนินต่อไปที่อินเตอร์เฟซโดยพลังงานจากตัวอย่าง ความแตกต่างของอุณหภูมิ (temperature gradient) ระหว่างแหล่งให้ความร้อน และอินเตอร์เฟซ (interface) การขนส่งความร้อนจากชั้นเยือกแข็งเกิดโดยการนำ (conduction) หรือการพา (convection) และการแผ่รังสี (radiation) ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่อง เมื่อน้ำแข็งละลายน้ำแล้วเกิดไอน้ำที่อินเตอร์เฟซ จะถูกนำไปยังเครื่องควบแน่นโดยการขนส่งมวล ซึ่งต้องอาศัยความแตกต่างของความกดดัน (pressure gradient) ระหว่างอินเตอร์เฟซ การรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ต้องควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการขนส่งความร้อนต่ออินเตอร์เฟซ ในขั้นตอนการระเหิดนี้จะระเหิดจนเหลือความชื้นในตัวอย่าง 15 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเปียก

2.2.3 การคาย (desorption) หลังจากผลึกน้ำแข็งระเหิดออกจากตัวอย่างแล้ว ที่เหลือเป็นสารละลายเข้มข้นอยู่กับส่วนชั้นที่แห้ง (dry layer) ส่วนที่เหลือนี้จะมีน้ำอยู่ 25–30 กรัม/100 กรัมของแข็งจะยึดแน่นและไม่เยือกแข็ง น้ำซึ่งยึดแน่นกับของแข็งที่เป็นองค์ประกอบของตัวอย่างเรียกว่า น้ำที่ถูกดูดซับ (sorbed water) จะถูกเปลี่ยนเป็นไอน้ำและถูกนำออกไปโดยการคาย (desorption) ซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายในการทำแห้ง ความคงที่ของโครงสร้างหรือเคมีของวัสดุจะขึ้นอยู่กับน้ำที่ยึดอยู่

น้ำที่ยึดอยู่กับของแข็งเป็นน้ำที่ต้องใช้ความกดดันต่ำกว่าน้ำบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิเดียวกัน การลดความกดดันมีผลต่อการยึดระหว่างน้ำและน้ำแข็ง การลดความกดดันลงเท่าใดขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของการยึด ตามทฤษฎีแล้วผลิตภัณฑ์จะหยุดปล่อยน้ำ (mass transport stop) เมื่อความกดดันของน้ำที่ตัวอย่าง เท่ากับ ความกดดันของน้ำที่เครื่องควบแน่น ซึ่งแรงขับเคลื่อน (driving force) จะเท่ากับศูนย์

การลดอุณหภูมิของเครื่องควบแน่นสามารถลดได้จาก –50°ซ ถึง –80°ซ ทำให้ความกดดันของน้ำลดลง และทำให้ความแตกต่างของความกดดัน (pressure gradient) เป็นศูนย์ที่ความกดดันของน้ำของตัวอย่างเมื่อมีความชื้นน้อยลง นอกจากนี้สามารถเพิ่มอุณหภูมิของตัวอย่างเพื่อเพิ่มความกดดันของน้ำของตัวอย่าง ทำให้เกิดความแตกต่างของความกดดันด้วย เมื่อเครื่องควบแน่นมีอุณหภูมิคงที่ เช่น เพิ่มอุณหภูมิจาก 20°ซ เป็น 30°ซ จะเพิ่มความกดดันจาก 23.2 มิลลิบาร์ เป็น 42.3 มิลลิบาร์ อย่างไรก็ตามควรคำนึงถึงความคงที่ของโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างด้วย ในขั้นตอนการคายน้ำนี้ จะเกิดการคายจนเหลือความชื้นในตัวอย่าง 2 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเปียกในการระเหิดและการคายน้ำ ไอน้ำของผลิตภัณฑ์จะถูกนำออกโดยการขนส่งมวลโดยมีปั๊มดูดอากาศช่วยนำออก แล้วไอน้ำจะถูกนำไปยังเครื่องควบแน่นและกลั่นตัวบนขดลวดทำความเย็น

2.3 เครื่องไลโอฟิไลซ์

เครื่องไลโอฟิไลซ์ (lyophilizer) คือ เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังนี้

2.3.1 แชมเบอร์ใส่ตัวอย่าง (sample chamber) เป็นภาชนะสำหรับใส่สารที่ต้องการทำแห้งแบบเยือกแข็ง อาจมีลักษณะเป็นหลอดหรือถ้วย หรืออาจเป็นห้องทำแห้งและมีถาด สำหรับใส่สารเพื่อทำแห้ง และอาจมีระบบทำความเย็นเพื่อแช่แข็งตัวอย่างได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ตัวควบแน่น (condenser) จะทำหน้าที่ดักจับไอน้ำที่อยู่เหนือผิวของผลิตภัณฑ์ โดยไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดของน้ำแข็งจะเคลื่อนตัวไปสู่พื้นที่ที่มีความดันต่ำกว่า (low pressure area) คือ บริเวณรอบๆ ผิวตัวควบแน่น และจะทำให้ไอน้ำแยกออกมาจากระบบ ทำให้ความชื้นในระบบลดลง

2.3.3 ปั๊มสุญญากาศ (high vacuum pump) ปั๊มเป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับดูดอากาศออกจากแชมเบอร์ ปั๊มที่มีประสิทธิภาพสูงจะทำให้ความดันในระบบลดลงจนเกิดสภาพสุญญากาศเพียงพอ (0.1 มิลลิเมตรปรอท) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เกิดการระเหิดของน้ำในผลิตภัณฑ์ และเป็นการกำจัดอากาศที่ไม่เกิดการควบแน่น (noncondensable gas) ออกไป ลดแรงเสียดทานภายในระบบ ช่วยทำให้การเคลื่อนที่ของไอน้ำเกิดได้ดีและยังเป็นการป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นระหว่างกระบวนการทำแห้งและช่วงเวลาเก็บรักษาได้

โดยปกติที่สภาพสุญญากาศประมาณ 5–50 มิลลิทอร์ (0.005–0.05 มิลลิเมตรปรอท) จะเป็นสภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ในเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยทั่วไป จะสามารถลดความดันได้ที่ประมาณ 100–120 มิลลิทอร์ (0.1–0.12 มิลลิเมตรปรอท) หรือต่ำกว่านี้เล็กน้อย ซึ่งนับว่าเพียงพอสำหรับการทำแห้งแล้ว

ภาพที่ 2.2 ส่วนประกอบของเครื่องแช่แข็งและผลิตภัณฑ์จากการแช่แข็ง

ที่มา : http://www.thaiscience.com/lab_vol/p30/freeze%20dryer.asp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ไครโอโปรเทคแทนต์

ไครโอโปรเทคแทนต์ (cryoprotectant) คือ สารประกอบใดๆ ที่เคลือบเซลล์และป้องกันเซลล์จากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความเย็นและอันตรายอื่นๆ ในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มอายุการเก็บรักษาและทำให้กิจกรรมของสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างปกติ

สารไครโอโปรเทคแทนต์สามารถใช้ในการแช่แข็งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งไวรัส, แบคทีเรีย, รา, สาหร่าย และโปรโตซัว รวมทั้งตัวอย่างและสารประกอบทางเคมีที่หลากหลาย แต่มีสารไครโอโปรเทคแทนต์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางและให้ผลที่น่าพึงพอใจ ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide Me_2SO), กลีเซอรอล (glycerol), ซีรัมอัลบูมิน (blood serum – serum albumin), สคิมมิลค์ (skimmed milk), เพปโตน (peptone), ยีสต์สกัด (yeast extract), แซคคาโรซ (saccharose), กลูโคส, เมทานอล, โพลีไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone PVP), ซอร์บิทอล และมอล์ทสกัด (malt extract) การเปรียบเทียบความเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ของแต่ละคู่ที่ใช้มีพื้นฐานรายงานจากผลการทดลองที่ได้รับการตีพิมพ์ชี้ให้เห็นว่า สารไครโอโปรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์, เมทานอล, เอทีลีนไกลคอล (ethylene glycol), โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) และซีรัมอัลบูมิน ขณะที่กลีเซอรอล, โพลิเอทีลีนไกลคอล, โพลิไวนิลไพโรลิโดนและซูโครส มีประสิทธิภาพน้อยกว่า และน้ำตาลอื่นๆ, เด็กซ์แทรน, ไฮดร็อกซีเอทิลสตาร์ช (hydroxyethyl starch), ซอร์บิทอลและนมมีประสิทธิภาพต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามไดออล (diols) และสารไครโอโปรเทคแทนต์อื่นๆ บางตัว เป็นพิษต่อจุลินทรีย์หลายชนิด ไดเมทิลซัลฟอกไซด์อาจจัดว่าเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพที่สุดในโลก ถึงแม้ว่าบางครั้งสารไครโอโปรเทคแทนต์ตัวอื่นจะสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์บางตัวได้ดีกว่า การเก็บรักษาโดยใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์มีปัจจัยจำนวนมากมีผลต่อประสิทธิภาพในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น สปีชีส์ (species), สายพันธุ์จุลินทรีย์, ขนาดของเซลล์ และรูปแบบการเจริญเติบโต (growth phase), อัตรา, อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม, องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth medium), พีเอช (pH), การให้อากาศ (aeration), ปริมาณน้ำในเซลล์ (cell water content), ปริมาณไขมัน (lipid content) และองค์ประกอบของเซลล์, ความหนาแน่นของอากาศขณะทำการแช่แข็ง, องค์ประกอบของส่วนที่แช่แข็ง (freezing medium), อัตราการทำให้เย็น (cooling rate), อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บและระหว่างการเก็บ, อัตราการทำให้อุ่น (warming rate), อาหารที่ใช้ในการเก็บ (recovery medium) และสิ่งที่สำคัญที่สุด คือ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เป็นตัวทำให้เชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยเพื่อทำการแช่แข็งถึงแม้จุลินทรีย์ (แบคทีเรียและสปอร์ของจุลินทรีย์) จะมีการรอดชีวิตที่ดีในการแช่แข็ง (deep–frozen) แต่บางครั้งสังเกตได้ว่าไม่มีสารที่เหมาะสมช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค้นพบว่ากลีเซอรอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์สามารถป้องกันเซลล์ยูคาริโอต (cell eukaryotic) รวมทั้งเซลล์จุลินทรีย์ต่อการทำลายจากการแช่แข็ง ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของเทคโนโลยีการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์สมัยใหม่

2.4.1 ประเภทของไครโอโปรเทคแทนต์แบ่งตามการออกฤทธิ์

2.4.1.1 ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้จะซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นในขณะแช่แข็งเซลล์ ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กลีเซลรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และแอลกอฮอล์หลายตัว เช่น เมธานอล, เอทานอล, โพรเพนไดออล เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงที่สุดรองลงมา ได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอล ตามลำดับ สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือ เป็นพิษต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อ

2.4.1.2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่ภายนอกเซลล์ และใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำมากกว่าพวกแรก และมีความเป็นพิษน้อยกว่า ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลีไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone PVP) และน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส, กลูโคส, แมนนิทอล เป็นต้น

2.4.2 ประเภทของไครโอโปรเทคแทนต์แบ่งตามคุณสมบัติความเป็นกรด–เบส

2.4.2.1 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด (acidic monomers) เช่น กลูตาเมต, แอสปาราจีน (asparagine), มาเลต (malate), และแอสปาร์เตต (aspartate)

2.4.2.2 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง (neutral monomers) เช่น กลีเซอรอล, กลูโคส, แลคโตส, ซูโครส, ราฟฟิโนส (raffinose), ซอร์บิทอล (sorbitol), ไซลิทอล (xylitol), และดีแอล–ทรีโอนีน (DL–threonine)

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

2.4.2.4 สารประกอบจำพวกพอลิเมอร์และดีเกรดเดทีฟ (polymers and its degradatives) เช่น อัลบูมิน (albumin), เจลาติน, มิวซิน (mucin), เพปโตน, แป้ง, เด็กซ์ตริน (dextrin), เพคติน (pectin), พอลิเมอร์ของซูโครส, เด็กซ์แทรน (dextran), เนื้อสกัด, ยีสต์สกัด, โพลีไวนิลไพรโรลิโดน, คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) และฟีคอล (phecol)

2.4.2.5 สารประกอบธรรมชาติ (natural substances) เช่น สคิมมิลค์และซีรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.6 สารประกอบจำพวกรีดิวซ์ (reducing agents) เช่น แอสคอร์เบต (ascorbate), ซีสทีอีน (cysteine), ไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine) และเซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide)

2.4.3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารไครโอโปรเทคแทนต์

เนื่องจากสารดังกล่าวมีมากมายหลายชนิด กลไกการทำงานของสารเหล่านี้จึงเข้าใจได้ยาก เพราะสารเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน เช่น กลีเซอรอล, ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้ ส่วนน้ำตาลซูโครสและกลูโคสเป็นผลึกละลายน้ำได้ เมื่อพิจารณาการแพร่ของสารเหล่านี้ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แอลกอฮอล์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เร็วกว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอลมีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ช้ากว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์

อย่างไรก็ตามเป็นที่เข้าใจกันดีว่าสารไครโอโปรเทคแทนต์ เหล่านี้จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยเมื่อเติมสารเหล่านี้จะเป็นเหตุให้จุดเยือกแข็งลดลง คุณสมบัติข้อนี้มีความสำคัญมากต่อการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ ปกติที่แรงดัน 1 บรรยากาศ น้ำจะแข็งตัวที่ 0 °ซ ซึ่งตามธรรมชาติของของเหลวภายในเซลล์จะมีจุดเยือกแข็งต่ำกว่า 0 °ซ ถ้ามีการเติมสารไครโอโปรเทคแทนต์ เข้าไปด้วยในระหว่างการแช่แข็งจะยิ่งทำให้จุดเยือกแข็งต่ำลงไปอีก ของเหลวภายในเซลล์จึงเย็นจัด (supercool) ก่อนที่จะเกิดผลึกน้ำแข็ง สารไครโอโปรเทคแทนต์จะช่วยเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งขึ้นกับความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากน้อยหรือไม่ได้เลย ด้วยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติประการนี้ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาแบบเยือกแข็งได้เนื่องจาก

2.4.3.1 ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ เป็นผลเนื่องมาจากการเติมสารไครโอโปรเทคแทนต์ ทำให้ของแข็งภายในเซลล์แข็งตัวช้า หรือแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่ไม่เติมสารไครโอโปรเทคแทนต์ ด้วยเหตุนี้เซลล์จะสูญเสียน้ำไปมาก น้ำยอมเหลืออยู่ในเซลล์น้อย การเกิดผลึกน้ำแข็งก็ย่อมเกิดได้น้อยตามไปด้วย ซึ่งการสูญเสียน้ำมากหรือน้ำน้อยขึ้นอยู่กับการลดอุณหภูมิ สารไครโอโปรเทคแทนต์ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ 2 วิธี คือ ทำให้ของเหลวแข็งตัวช้าและทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

2.4.3.2 ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ การแพร่ของสารไครโอโปรเทคแทนต์เข้าสู่เซลล์ สารนี้จะไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไป เนื่องจากเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

2.4.3.3 ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 ชนิดของไครโอโปรเทคแทนต์

สารไครโอโปรเทคแทนต์สามารถจำแนกได้หลายประเภท เช่น แบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล ตามกลไกการออกฤทธิ์ การแทรกซึมของสารผ่านเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นการแบ่งแบบดั้งเดิมของสารไครโอโปรเทคแทนต์ หรือแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีของสารไครโอโปรเทคแทนต์ ตารางที่ 2.1 แสดงสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ใช้ทางชีววิทยา ซึ่งเป็นการแบ่งตามโครงสร้างทางเคมี

ซัลฟอกไซด์

ซัลฟอกไซด์ (sulfoxides) คือ ออกซิไดซ์ไทโออีเทอร์ (oxidized thioethers) ประกอบด้วยออกซิเจน 1 อะตอมต่อโมเลกุล (ซัลฟอกไซด์มีคุณสมบัติเคมีส่วนใหญ่เฉื่อยและเมื่อเปรียบเทียบกับไทโออีเทอร์ (thioethers) สามารถละลายน้ำได้) ซัลฟอกไซด์ออกซิไดซ์ได้ซัลโฟน (sulfones) กับออกซิเจน 2 อะตอม ส่วนไดเมทิลซัลโฟน (dimethylsulfone) ไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมาก มีการแทรกซึมอย่างรวดเร็วและมีคุณสมบัติเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับจุลินทรีย์ จึงเป็นจุดเริ่มต้นในการใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และสเปิร์ม และยังสามารถประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาไวรัส, แบคทีเรีย, ริกเก็ตเซีย, ไมโครพลาสมา, คลาไมเดีย, ไซยาโนแบคทีเรีย, รา, ยีสต์, สาหร่าย และโปรโตซัว ความเข้มข้นของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม คือ 1 – 32 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) สำหรับเก็บรักษา *Anaplasma marginale* ในโบไวน์อาร์บีซี (bovine RBC) ขณะที่ *Dientamoeba fragilis* ต้องการเพียง 2.75 เปอร์เซนต์ *Entodinium simplex* และ *Entodinium caudatum* ต้องการ 3.9 เปอร์เซนต์ *Leptospira interrogans* 2.5 เปอร์เซนต์ และ *Microcystis aeruginosa* 3.0 เปอร์เซนต์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ดีกว่ากลีเซอรอลหรือสารไครโอโปรเทคแทนต์อื่นๆ สำหรับไวรัสบางตัว, *Spirillum volutans*, *Leptospira interrogans*, *Escherichia coli* และ *Lactobacillus delbrueckii*, *Lipomyces starkevi*, *Saccharomyces exiguous* และ *Candida bogoviensis*, *Neurospora crassa*, *Sclerospora sorphi*, *Pezizales*, *Volvariella valvaceg*, *Enteromorpha intestinalis*, *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Porphyra yesoensis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania tropica*, *Babesia* spp., *Naegleria* และ *Acanthamoeba* spp. อย่างไรก็ตามไดเมทิลซัลฟอกไซด์สามารถเป็นพิษต่อระบบทางชีวภาพของตัวอย่าง เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ ลดไตเตอร์ (titre) ของ T4 แบคเทอริโอเฟจเหลือเพียง 6 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารไครโอโปรแทคแทนต์ ที่ใช้กับจุลินทรีย์

Compound	Formula	MW
Sulphoxides		
Dimethylsulfoxide	$(CH_3)_2SO$	78.13
Monohydric alcohols and derivatives		
Methanol	CH_3OH	32.04
Ethanol	C_2H_5OH	46.07
Polyvinyl alcohol	$[CH_2CHOH]_n$	$2–12 \times 10^4$
Diols and derivatives		
Ethylene glycol	$(CH_2)_2(OH)_2$	62.07
Propylene glycol	$CH_3CH_2CH(OH)_2$	76.09
Trimethylene glycol	$CH_2(CH_2OH)_2$	76.09
Diethylene glycol	$O(CH_2)_4(OH)_2$	106.12
Polyethylene glycol	$H[OCH_2CH_2]_nOH$	$2–400 \times 10^2$
Polypropylene glycol	$H[OCHCH_3CH_2]_nOH$	$4–40 \times 10^2$
Polyethylene oxide	$(–CH_2CH_2O–)_n$	$3–80 \times 10^5$
Triols		
Glycerol	$(CH_2)_2CH(OH)_3$	92.09
Polyalcohols		
Mannitol, sorbitol, dulcitol	$C_6H_8(OH)_6$	182.17
Monosaccharides		
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.16
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	150.13
Disaccharides		
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30
Lactose, maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}·H_2O$	360.31
Trehalose	$C_{12}H_{22}O_{11}·2H_2O$	378.33
Trisaccharides		
Raffinose	$C_{18}H_{32}O_{16}·5H_2O$	594.52
Polysaccharides		
Dextran, mannan	$[C_6H_{10}O_5]_n$	$1–200 \times 10^3$
Dextrin	$(C_6H_{10}O_5)_x·xH_2O$	
Hydroxyethyl starch		
Ficoll		$7–40 \times 10^4$
Gum arabic (acacia)		2.5×10^5
Amides, *N*-alkylamides, imides		
Acetamide	NH_2COCH_3	59.07
Methylacetamide	$CH_3NHCOCH_3$	73.09
Dimethylformamide	$(CH_3)_2NCOH$	73.09
Dimethylacetamide	$(CH_3)_2NCOCH_3$	87.12
Succinimide	$NH(CO)_2(CH_2)_2$	99.09
Heterocyclic compounds		
Methylpyrrolidone	$CH_3N(CH_2)_3CO$	99.13
Polyvinylpyrrolidone	$[CHN(CH_2)_3CO]_n$	$3–36 \times 10^4$
Amino acids and carbonic acids		
Proline	$(CH_2)_3NHCHCOOH$	115.13
Glycine	CH_2NH_2COOH	75.07
Glutamic acid	$(CH_2)_2NH_2CH(COOH)_2$	147.13
Aminobutyric acid	$(CH_2)_2NH_2COOH$	103.12
Glutaric acid	$(CH_2)_3(COOH)_2$	132.12
Ammonium acetate	CH_3COONH_4	77.08
EDTA	$(CH_2)_2N_2(CH_2COOH)_4$	292.24
Proteins, peptides, polypeptides, and glycoproteins		
Blood serum, albumin		
Gelatin, peptones		
Shell extract		
Glycoproteins, mucin		
Valmomycin	$C_{54}H_{90}N_6O_{18}$	1111.33
Gramicidin	$C_{60}H_{92}N_{12}O_{16}$	1141.46
Complex substrates		
Yeast extract		
Malt extract		
Skimmed milk		
Honey		
Nonionic surfactants		
Tween 80		1309.68
Triton, macrocyclon		

ที่มา : Zdenek Hubálek (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Corynebacterium* และ *E.coli*) แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์จำนวนมากทนต่อความเข้มข้นของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่สูงมากและแบคทีเรียบางตัว (*Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus* และ *Streptomyces*) ยังสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20–45 เปอร์เซนต์ แต่มีแบคทีเรียจำนวนเล็กน้อย เช่น *Treponema pallidum* หรือ *Chlamydia* spp. และรา จำนวนมากไม่ทนต่อความเข้มข้นของไดเมทิลซัลฟอกไซด์สูงๆ *A .marginale* ที่แช่แข็งด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 4 โมลาร์ และเก็บที่ 25 °ซ เมื่อน้ำแข็งละลายเชื้อจะตายหลังจาก 96 ชั่วโมง ไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีความเป็นพิษน้อยกว่ากลีเซอรอลสำหรับ *L.interogans* และ *Trypanosoma* spp. แต่ไม่เป็นพิษต่อราหรือยีสต์ ถึงแม้ว่าสัดส่วนของการหายใจและการขาดการหายใจของยีสต์จะเพิ่มขึ้นในระหว่างการบ่มด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 9 เปอร์เซนต์หรือมากกว่านั้นที่ 30 °ซ แต่มีเพียงเล็กน้อยเมื่อยีสต์ถูกเก็บด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ ที่ 4 °ซ 14 วัน ขณะเดียวกันปฏิกิริยาเลทัลเอฟเฟ็กซ์ (lethal effect) ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อยีสต์ต่ำมาก ถึงแม้ความเข้มข้นของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ จะมีความเป็นพิษที่ 0 – 5 °ซ น้อยกว่าที่อุณหภูมิสูงกว่านี้และตัวอย่างที่แช่แข็งด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ผลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อ *T. pallidum* และจุลินทรีย์อื่นๆ จำนวนมากสามารถชะล้างโดยใช้ซีรัม 10 เปอร์เซนต์ หรือมากกว่านั้น แต่โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin BSA) หรือเจลาติน ไม่สามารถทำได้ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นพิษสำหรับสาหร่ายบางตัว (*Chlorella* และ *Crypthecodinium*) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ และสำหรับสาหร่ายทะเล (*Chaetoceras*, *Nannochloris*, *Rhodomonas*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis* และ *Tetraselmis*) ที่ความเข้มข้นของไดเมทิลซัลฟอกไซด์สูงมากๆ (20 – 30 เปอร์เซนต์) สปีชีส์ไฟโตแพลงค์โทนิค (phytoplanktonic) สามารถทนต่อการเก็บด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่สูญเสียความสามารถในการรอดชีวิต ไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีพิษต่อโปรโตซัวบางตัว ได้แก่ *Babesia*, *Trypanosoma* น้อยมากเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 4 °ซ เป็นเวลา 30 – 60 นาที แต่ *Naegleria acanthamoeba* ส่วนใหญ่จะไม่ทนไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 1 เปอร์เซนต์ สำหรับ *Babesia rodhaini* จะทนต่อไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 3 – 4 โมลาร์ ที่ 38 °ซ 1 – 4 ชั่วโมง แต่ไม่ทนที่ 4 °ซ และสำหรับ *L. tropica* ความเป็นพิษของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ 1.5 โมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยกว่ากลีเซอรอล 1 โมล สรุปแล้ว ควรจะหลีกเลี่ยงไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 15 เปอร์เซนต์ และควรนำซัสเพนชันเชื้อเก็บไว้ในอ่างน้ำแข็งเพื่อป้องกันผลกระทบของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่อาจเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลกอฮอล์และอนุพันธ์ของแฮลกอฮอล์

โพลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (polyhydric alcohols) โดยเฉพาะกลีเซอรอล แต่ไม่รวมไกลคอล (glycols) และน้ำตาลแอลกอฮอล์สามารถใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ได้ แต่ไม่ใช้โมโนวาเลนท์แอลกอฮอล์ (monovalent alcohols) อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษต่อระบบทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม เมทานอลและเอทานอลปริมาณเล็กน้อยสามารถให้ประสิทธิภาพที่น่าพอใจ และมีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อยสำหรับเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอตบางตัว

เมทานอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือกลีเซอรอลสำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ไวต่อไครโอโปเทคแทนต์ เหมาะสำหรับแช่เย็น *Euglena gracilis* ด้วยไนโตรเจนเหลว (LN) และมีประสิทธิภาพมากสำหรับแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) : *Chloroflexus* spp., *Methylomonas* spp., *Methylococcus* spp. และ *Methylocystis* spp. แต่เมทานอลไม่มีประสิทธิภาพในรูปของไดอะตอม (diatoms) และมีอัตราการแทรกซึมที่สูงมาก สังเกตเห็นได้ในเซลล์สาหร่าย ซึ่งเมทานอลเป็นพิษต่อสาหร่ายทะเลที่ความเข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซนต์ และ *Tetraselmis chuii* มากกว่า 20 เปอร์เซนต์ เมทานอล 5 เปอร์เซนต์ สามารถเปรียบเทียบได้กับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ใน *Nanochloris atomus* และ *Nannochloropsis gaditana* แต่แตกต่างจากไดเมทิลซัลฟอกไซด์เนื่องจากเมทานอลไม่สามารถป้องกัน *Rhodomonas baltica*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceras gracilis* และ *T. chuii* เมทานอลมีความเป็นพิษต่อ *E. gracilis* น้อยกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์และกลีเซอรอล

เอทานอลเมื่อเทียบกับกลีเซอรอลจะแสดงให้เห็นผลของไครโอโปรเทคแทนต์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ *S. cerevisiae* ถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แต่ไม่เห็นผลเมื่อถูกทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ (3 °ซ/นาที) เอทานอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ทางจุลชีววิทยาที่ความเข้มข้น 2 – 10 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 9 เปอร์เซนต์) สำหรับ *Chlorella* เอทานอลมีความเป็นพิษมากกว่าและป้องกันได้น้อยกว่าเมทานอลมาก โดยปกติความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ของแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่ ขณะที่ความสามารถในการป้องกันจะลดลง

โพลิไวนิลแอลกอฮอล์ มีประสิทธิภาพในการป้องกัน *T. foetus* จากการแช่แข็งน้อยกว่ากลีเซอรอล การป้องกันของโพลิไวนิลแอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซนต์ ผสมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ต่อ *Pseudoperonospora humuli* และ plasmapara : *viticola sporangia* ให้ผลที่น่าพึงพอใจและให้ประสิทธิภาพดีในการเก็บรักษา plasmid – bearing: *Alcaligenes eutrophus*

เอทิลีนไกลคอล (EG) ใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ความเข้มข้น 2 – 40 เปอร์เซนต์ (ค่ามาตรฐาน 10 เปอร์เซนต์) สำหรับแช่แข็งจุลินทรีย์พวกไมโซไมซีท (myxomycete) : *Physarella oblonga*, actinomycetes, rumen fungi, สาหร่ายและโปรโตซัว สปอร์ของ *Aspergillus flavus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทนต่อเอทิลีนไกลคอลที่ความเข้มข้น 4 หรือ 10 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพมากกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือโพรไพลีนไกลคอล เมื่อใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ของ anaerobic rumen, fungus : *Piromyces communis* รวมทั้ง proline 5 เปอร์เซนต์ ต่อ algae : *Eisenia bicyclis* แต่เอทิลีนไกลคอลไม่มีประสิทธิภาพในการเก็บแช่แข็ง *Sclerospora spores* และน้อยกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือกลีเซอรอลสำหรับ *Trichomonas vaginalis*, *Tetrahymena pyriformis* และ *Plasmodium chabaudi* แต่เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ดีมากสำหรับ *Leucocytozoon smithi* ที่แขวนลอยในซีรัมของลูกวัว (foetal calf serum FCS) 10 เปอร์เซนต์ เอทิลีนไกลคอล, โพรไพลีนไกลคอล หรือไตรเมทิลีนไกลคอล (trimethylene glycol) 2.5 – 5 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือกลีเซอรอล แต่เป็นพิษสำหรับโปรโตซัวบางตัวมาก

โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol PG) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ทางจุลชีววิทยาที่ความเข้มข้น 5 – 10 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 5 เปอร์เซนต์) เมื่อใช้ร่วมกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ สามารถป้องกัน *S. cerevisiae*, *Zoophthora radicans* และ *E. bicyclis* ได้ดีมาก เมื่อใช้ 5 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพในการแช่แข็ง *P. yezoensis* ได้ดีมาก และ 10 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพในการป้องกัน *L. smithi*, *Actinomycea noursei* ได้เป็นอย่างดี ซึ่งอาจดีกว่ากลีเซอรอล โพรไพลีนไกลคอล 5 เปอร์เซนต์ หรือไดเอทิลีนไกลคอล หรือโพลีเอทิลีนไกลคอล–2000 ป้องกันได้น้อยมาก โพรไพลีนไกลคอลมักใช้ร่วมกับฟิคอล (ficoll) และไดเมทิลอะเซทาไมด์ (dimethylacetamide) สำหรับแช่แข็ง *Ichthyophthirius multifiliis* ส่วนไตรเมทิลีนไกลคอล (trimethylene glycol) เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับ *Leucocytozoon protozoa*

ไดเอทิลีนไกลคอล (diethylene glycol) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ทางจุลชีววิทยาที่ความเข้มข้น 5 – 45 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) ที่มวลโมเลกุลระหว่าง 200 และ 40,000 ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งและการละลายเชื้อ *A. noursei* โพลีเอทิลีนไกลคอล –6000 มวลโมเลกุล 1,500–3,000 เมื่อใช้ร่วมกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ ให้ประสิทธิภาพในการแช่แข็ง *P. yezoensis* โพลีเอทิลีนไกลคอลมีประสิทธิภาพเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์, ไดเมทิลอะเซทาไมด์, ไดเมทิลฟอร์มาไมด์, โพลีไวนิลไพรโรลิโดน, กลูโคส, ซูโครส และอัลบูมินในการป้องกัน *E. aerogenes* ที่แช่แข็งอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวและเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับเห็ด 9 สปีชี่ส์ โพลีเอทิลีนไกลคอล 10 เปอร์เซนต์มีประสิทธิภาพดีกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ หรือกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามโพลีเอทิลีนไกลคอล– 4000 และโพลีเอทิลีนไกลคอล 20,000 นั้นมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารตัวอื่นๆ อย่างมาก (ไดเมทิลซัลฟอกไซด์, กลีเซอรอลและซอร์บิทอล) ในการป้องกันยีสต์ระหว่างการแช่แข็งและการละลาย *Theileria parva*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

sporozoites สามารถเก็บรักษาด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล 5 เปอร์เซนต์ ได้ดีเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ ถึงแม้ว่าจะดีน้อยกว่ากลีเซอรอล 7.5 เปอร์เซนต์

โพลีเอทิลีนออกไซด์ (polyethylene oxide) (โพลิออกซีเอทีลีน (polyoxyethylene)) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพในทางชีววิทยาที่ความเข้มข้น 5 – 15 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) โพลีเอทิลีนออกไซด์ –400 (5 – 15 เปอร์เซนต์) เมื่อใช้ร่วมกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ สามารถป้องกัน T4 เฟจ ในการป้องกัน *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi* และ *E. coli* ด้วยโพลีเอทิลีนออกไซด์ –400 และโพลีเอทิลีนออกไซด์ –4000 มีประสิทธิภาพเท่ากับกลีเซอรอล

กลีเซอรอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ใช้อย่างกว้างขวางมากที่สุดทางจุลชีววิทยา การเพิ่มกลีเซอรอล 5 – 42 เปอร์เซนต์ เพื่อซัสเพนชันเชื้อ *E. coli* ในน้ำจะยอมให้จุลินทรีย์รอดชีวิตได้นานที่ –20 °ซ กลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ และใช้เก็บรักษาโปรคาริโอตและไวรัสที่อุณหภูมิระหว่าง 4 และ –20 °ซ เป็นประจำตั้งแต่ก่อนช่วงศตวรรษที่ 1950s กลีเซอรอลสามารถใช้ที่ความเข้มข้น 2 – 55 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) สำหรับแช่แข็งไวรัส, แบคทีเรีย, ริกเก็ตเชีย, ไมโครพลาสมา, ไมโซไมซีท, รา, ยีสต์, สาหร่ายและโปรโตซัว รามีชีวิตรอดจากการแช่แข็งได้ดีเมื่อใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ซึ่งดีกว่ากลีเซอรอล และกลีเซอรอลมีผลกระทบเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลยต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Spirillum*, *Anaplasma* และ *T. vaginalis* กลีเซอรอลดีกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์สำหรับ *T. parva*, *L. interrogans* และ *Tetreselmis suecica* ความเป็นพิษของกลีเซอรอลสามารถสังเกตได้ใน *Aegypyianella pollorum*, *Chtamydia* spp., *Rhodospirillum rubrum*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium diahteriae*, *E. coli*, *Chlorella*, *T. pyriformis*, *Trypanosoma* spp., *T. vaginalis* และ *T. foetus* กลีเซอรอลมีความเป็นพิษมากกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อ *Newcastle diseasc*, *Anaplasma phagocytophila*, *L.interrogans*, *Plasmodium* spp., *L. tropica*, *Trypanosoma* spp., *T. vaginalis*, *T. foetus*, *T. gondii*, *E. gracilis* และ *T. pyriforms* แต่กลีเซอรอลมีความเป็นพิษน้อยกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์สำหรับ *B. rodhaini*, *Trypanosoma congolense*, *Leishmania*, *marine microalgae*, *Chlorella marina*, *Chaetoceras calcitrans*,*Tetraselmis gracilis* และ *Crypyhecodinium cohnii*

แมนนิทอล (mannitol) 5 เปอร์เซนต์ มีประสิทธภาพน้อยกว่ากลีเซอรอลในการแช่แข็ง *S. cerevisiae*, *E. bicyclis* และ *T. foetus* และมีประสิทธิภาพน้อยมากหรือไม่มีเลยสำหรับ *S. cerevisiae* และ *S. uvarum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97116

ซอร์บิทอล (sorbitol) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ทางจุลชีววิทยาที่ความเข้มข้น 1 – 36 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 9 เปอร์เซนต์) เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ไม่เป็นพิษสำหรับ *E. intestinalis* และมีประสิทธิภาพเท่ากับแมนนิทอล 5 เปอร์เซนต์สำหรับ *E. bicyclis* ส่วน *Lipomyces starkeyi* และ *Sacchoromyces exiguous* มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงในซอร์บิทอล 10 เปอร์เซนต์ สังเกตได้ภายหลังจากการแช่แข็งและการละลาย ซึ่งอัตราการรอดชีวิตคล้ายกับเชื้อที่แขวนลอยในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ มากกว่ากลีเซอรอลและโพลีเอทิลีนไกลคอล ถึงแม้ว่า *Candida bogoriensis* ป้องกันด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ได้ดีกว่าซอร์บิทอล 2 โมลาร์ แต่ *Schizosacchromyces prombe* และ *S. cerevisiae* ไม่ใช้ซอร์บิทอลเพียงอย่างเดียวแต่นิยมใช้ซอร์บิทอล 3.6 เปอร์เซนต์ร่วมกับกลีเซอรอล (17.5 หรือ 19 เปอร์เซนต์) *Plasmodium berghei*, *P. falciparum* และ *bacteria microti* ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ผสมกับซอร์บิทอล การผสมของซอร์บิทอล 1 โมลาร์กับโพลีไวนิลไพรโรลิโดน– 40,000 15 เปอร์เซนต์ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แช่แข็งสปอร์ของ *Ustilago maydis* และซอร์บิทอล 0.5 โมลาร์ผสมกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์เป็นไครโอโปรเทคแทนต์ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Poropyra* และ *Tetraselmis*

แซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์

กลูโคสมักใช้เป็นไครโอโปเทคแทนต์ทางจุลชีววิทยาที่ความเข้มข้น1 – 18 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 4 เปอร์เซนต์) การปรับปรุงการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียที่ – 20 °ซ โดยใช้สารละลายกลูโคสมีประสิทธิภาพสำหรับ T 4 เฟจ, *A. marginale* , *E. aerogene*, *Puccinia spores*, *P. berghei*, *Babesia* spp. (ร่วมกับโพลีไวนิลไพรโรลิโดน) และ *Enteamoeba histolytica*, *Phytophttiora plamivora*, *Entemophthora exitialis*, *Pythium sylvaticum* และ *Pseudophaeolus baudonii* เมื่อใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ ร่วมกับกลูโคส 8 เปอร์เซนต์ ดีกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ เพียงอย่างเดียว กลูโคสมีความเป็นพิษต่อโปรโตซัว *T. pyriformis* ที่อุณหภูมิห้อง

ไซโลส (xylose) มักใช้ที่ความเข้มข้น 1 – 68 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ของเชื้อ *Trypanosoma brucei*

ซูโครสมักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 1 – 68 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) ผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ของน้ำตาลไดแซคคาไรด์นี้อธิบายโดย Keith (1995) ซึ่งสังเกตการรอดชีวิตของ *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Proteus* และ *Micrococcus* spp. เมื่อแช่แข็งด้วยซูโครส 10 เปอร์เซนต์ ที่ 10 °ซ เป็นระยะเวลานาน ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่มีความเข้มข้นหลายระดับสำหรับไวรัส, *E. coli*, *E. aerogenes*, *Lactococcus lactis*, *L. delbrueckii*, *Methanococcus vannielii*, *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., *A. marrginale*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ร่วมกับกลูโคส), *B. rodhaini* แต่ซูโครสมีประสิทธิภาพต่ำสำหรับจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารไครโอโปรเทคแทนต์บางตัว เช่น *Cyanobacterium, Spirulina platensis* ยกเว้นซูโครส 5 เปอร์เซนต์ สามารถป้องกันหัวเชื้อเริ่มต้นของสายพันธุ์ *L. lactis spp. lactis* ดีกว่ากลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บที่ –20 ถึง –70 °ซ ซูโครสเป็นพิษต่อ *T. pyriformis* ที่อุณหภูมิห้อง

แลคโตสที่ความเข้มข้น 1 – 10 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 8 เปอร์เซนต์) ให้การป้องกันที่ดีกว่ากลีเซอรอลในเชื้อเริ่มต้นของ *L. lactis spp. lactis* ที่เก็บที่ –20 ถึง –70 °ซ แลคโตสมีประสิทธิภาพเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ในการแช่แข็ง *E. coli*, *L. delbrueckii*, *S. cerevisiae* แต่มีประสิทธิภาพน้อยในการแช่แข็ง *S. platensis* แลคโตส 5 เปอร์เซนต์ร่วมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ ให้ดีกว่ากลีเซอรอลหรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์เพียงอย่างเดียวต่อ *S. cerevisiae, Pseudomonas aureofaciens* และ *S. tenehrarius*

มอลโตสร่วมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับ *Scenedesmus* spp.

ทรีฮาโลสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่พบในพืชและเซลล์สัตว์ มักใช้ที่ความเข้มข้นที่ 5 – 1 9 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) เหมาะสำหรับไวรัส, *S. cereviside*, psychrophilic yeast, *Lactobacillus bulgaricus* และ *mycorrhizal fungus* ทรีฮาโลสก่อให้เกิดหลุมภายในจุลินทรีย์ยูคาริโอตขนาดใหญ่หลายชนิด (มากกว่า 8 เปอร์เซนต์ น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งอาจเป็นบทบาทการป้องกันเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง ปริมาณทรีฮาโลสสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของยีสต์ภายหลังการทำแห้ง เมื่อยีสต์เจริญในสภาพไม่มีอากาศ ประสิทธิภาพของทรีฮาโลสในการเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์จะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะพบว่าทรีฮาโลสที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงอย่างมาก ภายใต้สภาพที่มีอากาศบ้าง เมื่อเปรียบเทียบกับทรีฮาโลสที่ระดับปกติ

ราฟฟิโนส (raffinose) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ของ *Scencdesmus quadricauda*, *S. brasihensis* และ *Chlorella vulgaris* ที่ 5 เปอร์เซนต์ร่วมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ แต่ไม่ได้ทดสอบสารไครโอโปรเทคแทนต์ของไตรแซคคาไรด์ตัวอื่น

เด็กซ์แทรน (dextran) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ความเข้มข้น 5 – 15 เปอร์เซนต์ สามารถป้องกัน *E. coli* ที่แช่แข็งได้พอประมาณ เด็กซ์แทรน (5 เปอร์เซนต์, มวลโมเลกุล 5ง0,000) สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของ *Pseudomonas* F8 จาก 2 เปอร์เซนต์ (ตัวควบคุม) เป็น 78 เปอร์เซนต์ เมื่อแช่แข็งในน้ำเกลือ และเหมาะสมปานกลางสำหรับ *E. intestinalis* เด็กซ์แทรนเมื่อใช้ร่วมกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพในการแช่แข็ง *P. yezoensis* อย่างรวดเร็ว ระดับโพลิเมอไรเซชันของเด็กซ์แทรนมีผลต่อประสิทธิภาพในการเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pseudomonas F8 มวลโมเลกุลที่เหมาะสมคือ 250 – 1,000 กิโลดาลตัน ขณะที่มวลโมเลกุล 20 – 100 กิโลดาลตันนั้นไม่สามารถเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ได้ โดยปกติเด็กซ์แทรนไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์

โพลีแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (extrecellular polysaccharides) ที่ผลิตโดยยีสต์ *S. cerevisiae* และ *Hansenula capsulate* กลูโคแมนแนน (glucomannans) มักใช้บางส่วนเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของยีสต์หลายสายพันธุ์ที่แช่เข็งในไนโตรเจนเหลวกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ หรือกลีเซอรอล

อินนูลิน (inulin) หรือฟรักโทแซน(fructosan) และไกลโคเจน เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ตามธรรมชาติที่สามารถละลายน้ำได้ แต่ไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเป็นไครโอโปเทคแทนต์ในการป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามอินนูลินที่มีลักษณะคล้ายไกลโคเจน (glycogen – like) หรือโพลีกลูโคส (polyglucose) เป็นวัตถุดิบสะสมในเซลล์ *E. coli* ที่มีสภาพการเจริญเติบโตที่หลากหลาย ป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายจากแช่แข็งและการละลาย

ไฮดรอกซีเอทิลสตาร์ช (hydroxyethyl starch HES) (2.5 – 25 เปอร์เซนต์, ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) ส่วนใหญ่ใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับซีรัม 5 เปอร์เซนต์ หรือ โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin BSA) 3.4 เปอร์เซนต์ ในไนโตรเจนเหลวสำหรับเก็บรักษา *P. berghei*, *T. parvasporozoites*, *S. cerevisiae*, *Methylomonas* และ *Methylococcus* spp. แต่ไฮดรอกซีเอทิลสตาร์ชมีประสิทธิภาพดีกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือกลีเซอรอล

เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose) 1 เปอร์เซนต์ สามารถป้องกัน *Micrococcus luteus* และ *Stephylococcus epidermidis* ที่ –14 °ซ ดีกว่ากลีเซอรอล 15 เปอร์เซนต์

ฟิคอล (ficoll) เป็นโพลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่มีประจุ (nonionic synthetic polymer) มักใช้ที่ความเข้มข้น 5 – 7.5 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 6 เปอร์เซนต์) เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือโพลีไวนิลไพรโรลิโดน สำหรับแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวของเชื้อ *A. phagocytophita* และฟิคอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพในการแช่แข็ง *P. yezoensis* ส่วนไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ ร่วมกับฟิคอล 6 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ตัว ที่ถูกทดสอบสำหรับแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวของยีสต์ บทบาทของฟิคอลในการเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ยังคงไม่ชัดเจน ซึ่งมักใช้ร่วมกับโพรไพลีนไกลคอลและไดเมทิลอะเซทาไมด์สำหรับแช่แข็ง *I. multifihis*

กัมอราบิค (gum arabic) (กัมอคาเชีย (gum acacia) 2 – 10 เปอร์เซนต์) เป็นโพลิเมอร์แบบกิ่งประกอบด้วยกาแลคโตส, แรมโนส, อราบิโนสและกรดกลูคูโรนิค เป็นไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับ T 2 แบคเทอริโอเฟจ ที่ดีกว่ากลีเซอรอล, ไดเมทิลซัล ฟอกไซด์ หรือแลคโตส และยังประสบความสำเร็จเมื่อใช้กับ *S. platensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอไมด์และไอไมด์

เอไมด์ (amide) และไอไมด์ (imide) ชนิดต่างๆที่ใช้เป็นไครโอโปรเทคแทนต์ ได้แก่ อะ'ซทาไมด์ (acetamide), ไดเมทิลอะเซทาไมด์ (dimethylacetamide) และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide) มักใช้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ และมีประสิทธิภาพดีที่สุดเท่ากับกลีเซอรอล อะเซทาไมด์จัดเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ทางจุลชีววิทยาโดย Lovelock (1995) ซึ่งมักใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 หรือ 2 เปอร์เซนต์ สำหรับแช่แข็ง *Streptococci L. lactis, L. lactis spp. Cremoris* และ *L. lactis spp. diacetylactis* ในสคิมมิลค์ ผลของอะเซทาไมด์สำหรับแช่แข็ง *T.brucei* ยังไม่ถูกยืนยัน ไดเมทิลอะเซทาไมด์มักใช้ร่วมกับฟิคอลและโพลีเอทิลีนไกลคอลสำหรับแช่แข็ง *I. multifiliis*

ซัคซินิไมด์ (succinimide) มักใช้เป็นไครโอโปรเทคแทนต์ที่ความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซนต์ สำหรับ *Lactobacillus leichananii*

เปปไทด์, โปรตีนและไกลโคโปรตีน

ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin) มักใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับไวรัสและริกเกตเชียที่ความเข้มข้น 0.1 – 4 เปอร์เซนต์ และมีประสิทธิภาพเท่ากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์สำหรับแช่แข็งไวรัสกับ *E. aerogenes* ที่ – 65 °ซ เมื่อเปรียบเทียบความเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับกลีเซอรอล พบว่าซีรัมอัลบูมินสามารถป้องกัน *E. coli* และไมโครแบคเทอเรียมที่ถูกแช่แข็งได้พอประมาณ ผลของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 0.5 เปอร์เซนต์ ต่อ *L. interrogans* ดีกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ แต่ต่ำกว่ากลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ *S. platensis* สามารถแช่แข็งอย่างมีประสิทธิภาพทั้งในโอวัลบูมิน, โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน, เคซีนไฮโดรไลเซส (casein hydrolysate) หรือเจลาติน 2 – 4 เปอร์เซนต์ ส่วนสคิมมิลค์ และเคซีนไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมสำหรับ *T. gondii* เมื่อใช้ร่วมกับโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 4 เปอร์เซนต์ หรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12.5 เปอร์เซนต์

ซีรัมจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (ลูกวัว, ม้า,แกะ, มนุษย์, กระต่าย และไก่) มักรวมเข้าในอาหารแช่แข็งที่ความเข้มข้น 10 – 20 เปอร์เซนต์ กับสารไครโอโปรเทคแทนต์ตัวอื่นๆ สำหรับแช่แข็งไวรัส, แบคทีเรียบางชนิดรวมทั้งคลาไมเดีย, ไมโครพลาสมา, ไซยาโนแบคทีเรีย, ยีสต์, ราและโปรโตซัว นอกจากนี้ประสิทธิภาพการเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ของซีรัม หรือซีรัมอัลบูมินอาจป้องกันเซลล์จากสารพิษของกลีเซอรอล, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือสารไครโอโปรเทคแทนต์ตัวอื่นๆในระหว่างการแช่แข็งและการละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สคิมมิลค์

สคิมมิลค์ (skimmed milk) มักใช้เป็นไครโอโปรเทคแทนต์ที่ความเข้มข้น 1– 10 เปอร์เซนต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) และมักใช้ในการทำแห้งแบบแช่แข็งจุลินทรีย์หลายชนิด บางครั้งใช้ร่วมกับสารไครโอโปรเทคแทนต์ตัวอื่นๆ Keith (1995) อธิบายผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ของสคิมมิลค์ต่อ *E. coli* เมื่อแช่แข็งที่ – 20 °ซ *Mycobacterium tuberculosis* ที่แขวนลอยในสคิมมิลค์สามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซนต์ อย่างน้อย 1 ปี เมื่อเก็บที่ – 70 °ซ สคิมมิลค์มักใช้เป็นไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับ *L. interrogans*, *mycoplasmas*, *Pasteurella multocida* และแบคทีเรียกรดแลคติค สคิมมิลค์ร่วมกับกลีเซอรอลมีประสิทธิภาพในการเป็นไครโอโปเทคแทนต์ของไฟโตฟาโตจีนิค, แบคทีเรียและรา *S. cerevisia*, *Debaryomyces hanseni* และ *Kluyveromyces marxianus* มีประสิทธิภาพในการป้องกันเมื่อใช้สคิมมิลค์ 10 เปอร์เซนต์ ร่วมกับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ ซีรัมเจือจางในสคิมมิลค์ที่มี *T. foetus* และเก็บที่ – 79 °ซ *Trichomonads* เมื่อใช้สคิมมิลค์สามารถมีชีวิตรอดเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน สคิมมิลค์ใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ในการเก็บรักษาไวรัสที่ – 70 °ซ ได้ดีกว่าซีรัมกระต่าย, ไข่แดง, อแลนโทอิน (allantoin fluid)

2.4.5 ความบ่อยการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์

โดยทั่วไปมีการใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์และกลีเซอรอลอย่างกว้างขวางทางจุลชีววิทยา ซึ่งได้รับข้อมูลจากหนังสือคู่มือการสั่งซื้อสินค้าเกี่ยวกับไครโอโปรเทคแทนต์จำนวนมาก ตาราง 2.2 แสดงความบ่อยในการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ ซึ่งได้รับข้อมูลจากหนังสือคู่มือการสั่งซื้อ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 314 ครั้ง, กลีเซอรอล 308 ครั้ง, ซีรัมอัลบูมิน 238 ครั้ง, สคิมมิลค์ 61 ครั้ง, ซูโครส 44 ครั้ง, เพปโตน 38 ครั้ง, ยีสต์สกัด 16 ครั้ง, กลูโคส 32 ครั้ง, โพลีไวนิลไพรโรลิโดน 29 ครั้ง, เมทานอล 25 ครั้ง, เอนไซม์จากถั่วเหลือง 21 ครั้ง, ซอร์บิทอล 15 ครั้ง, มอล์ทสกัด 13 ครั้ง, เด็กซ์แทรน 13 ครั้ง, และเอทิลีนไกลคอล 10 ครั้ง สารไครโอโปรเทคแทนต์อื่นๆ บันทึกในหนังสือตีพิมพ์เกี่ยวกับจุลชีววิทยา แม้ว่าสถิตินี้อาจจะขัดแย้งกับลูกค้าจุลชีววิทยาบางกลุ่ม ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ใช้กับเชื้อราน้อยกว่ากลีเซอรอล แต่ใช้ในการเก็บรักษาพวกสาหร่ายและโปรโตซัวมาก เมทานอลใช้ในการเก็บรักษาสาหร่ายอย่างกว้างขวางในขณะที่เพปโตน, ยีสต์สกัด และมอลต์สกัดถูกหลีกเลี่ยง ส่วนสคิมมิลค์นิยมใช้เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับแบคทีเรีย

2.4.6 การใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ผสมกัน

สารไครโอโปรแทคแทนต์ สามารถใช้ร่วมกับสารประกอบอื่นหรือสารสกัดจากเซลล์ สารไครโอโปรเทคแทนต์แต่ละคู่มีผลต่อการเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ต่างกัน องค์ประกอบหนึ่งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนผสมอาจมีประสิทธิภาพดีกว่าอีกองค์ประกอบหนึ่ง หรืออาจทำปฏิกิริยาร่วมกันทำให้เกิดประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งการแสดงออกของสารไครโอโปรเทคแทนต์ร่วมกันสามารถสังเกตเห็นสารไครโอโปรเทคแทนต์แต่ละตัว นิยมใช้สารที่ซึมผ่านอย่างรวดเร็วร่วมกับสารที่ซึมผ่านอย่างช้าๆ ในการเป็นสารไครโอโปเทคแทนต์สำหรับจุลินทรีย์ เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์, กลีเซอรอล, เมทานอลกับกลูโคส, ซูโครส, แลคโตส, ซอบิทอล, เมทิลเซลลูโลส, โพลีเอทิลีนไกลคอล –6000 และโพลีไวนิลไพรโรลิโดน 5 เปอร์เซนต์ หรืออาจจะรวมไครโอโปรเทคแทนต์ 3 ตัวก็ได้ เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับกลูโคส และโพลีเอทิลีนไกลคอล ส่วนไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ กับกลูโคส 8 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพดีกว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือกลูโคสเพียงอย่างเดียว มีการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ผสมกันกับเชื้อราที่มีความไวต่อสารไครโอโปรเทคแทนต์ เช่น *Entomophthora exitialis*, *Pythium sylratium* และ *Pseudophaeolus baudonii* มีการใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12 เปอร์เซนต์ กับกลูโคส 4–10 เปอร์เซนต์ กับ *Acanthamoeba castellani*, *Naegleena australiensis* และ *N. fowlevis* และใช้กลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ ร่วมกับแลคโตส, มอลโตส หรือราฟฟิโนส 5 เปอร์เซนต์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ของยีสต์ (*S. cerevisiae*) แบคทีเรีย (*P. aureofaciens* และ *S. tenebraius*) และสาหร่าย (*Scendesmus* spp., *C. vulgaris* และ *Anacystis nidulans*) การใช้ซูโครส, โพลีไวนิลไพรโรลิโดน และเมทานอลร่วมกันจะทำให้เชื้อ *Scenedesmus subspicatus* มีชีวิตรอดเป็น 2 เท่าของการใช้ซูโครสเพียงอย่างเดียว ส่วนกลีเซอรอลผสมกับซอร์บิทอลให้ผลสำเร็จในการเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับ *P. falciparum* และโพลีไวนิลเอทานอล 10 เปอร์เซนต์ กับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษา plasmid–bearing *Alcaligenes eutrophus*

2.4.7 ความสมดุลของการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์

ความสมดุล (equilibration) ของการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์สามารถอธิบายได้ทั้งซัสเพนชันของเชื้อที่สัมผัสกับไครโอโปรเทคแทนต์ที่สามารถซึมผ่านได้ในเวลาที่ต้องการ ความสมดุลของสารละลายภายในเซลล์ก่อนการแช่แข็ง โดยทั่วไปไดเมทิลซัลฟอกไซด์ใช้เวลา 10– 60 นาที ที่ 0–10 °ซ หรือเมทานอลซึ่งเป็นไครโอโปรเทคแทนต์ที่ซึมผ่านอย่างรวดเร็วและใช้เวลาสมดุลไม่นาน โดยปกติที่ 4 °ซ 15 นาที ก็เพียงพอแล้ว อุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมของกลีเซอรอลต่อเซลล์ควรจะสูงและนานกว่า (1–4 ชั่วโมง) กลีเซอรอลมีประสิทธิภาพในการเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ของ *T. vaginalis* ที่ความสมดุล 0–5 °ซ น้อยกว่าที่ 37 °ซ อัตราการรอดชีวิตจะเพิ่มขึ้นอย่างค่อยๆไปกับความสมดุลที่ 25 °ซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นในการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์

(ข้อมูลจากหนังสือตีพิมพ์เกี่ยวกับไครโอโปรเทคแทนต์)

Compound	Viruses	Bacteria	Fungi	Algae	Protozoa
Me_2SO	14/6	42/12	31/18	42/17	76/56
Methanol	—	2/0	2/1	17/2	0/1
Ethanol	—	—	1/0	1/0	—
Polyvinyl alcohol	—	0/1	1/0	—	1/0
Ethylene glycol	—	1/0	3/1	1/1	2/1
Propylene glycol	—	1/0	2/0	1/1	0/2
Trimethylene glycol	—	—	—	—	1/0
Diethylene glycol	—	2/0	—	—	—
Polyethylene glycol	—	3/0	2/0	0/1	0/1
Polyethylene oxide	1/0	3/0	—	—	—
Glycerol	7/6	63/23	79/5	17/4	56/48
Mannitol and dulcitol	—	—	1/0	1/0	—
Inositol	—	0/1	1/0	—	—
Sorbitol	1/0	—	1/1	2/7	0/3
Glucose	1/0	2/9	5/3	—	0/12
Xylose	—	—	—	—	0/2
Sucrose	6/0	14/7	4/5	4/2	0/2
Lactose	—	2/3	1/1	—	—
Maltose	—	—	—	0/1	0/8
Trehalose	1/0	1/2	3/1	—	—
Raffinose	—	—	—	0/1	—
Dextran	1/0	7/1	1/0	1/1	0/1
Hydroxyethyl starch	—	1/0	1/0	—	0/3
Methyl cellulose	—	1/0	—	—	—
Ficoll	—	1/0	0/1	0/1	0/1
Gum arabic (acacia)	1/0	1/0	—	—	—
Acetamide	—	1/1	—	—	0/1
Dimethylformamide	—	1/0	—	—	—
Dimethylacetamide	—	1/0	—	—	0/1
Succinimide	—	1/0	—	—	—
Methylpyrrolidone	—	1/0	—	—	—
Polyvinylpyrrolidone	1/0	7/1	1/0	5/2	0/12
Proline	—	—	—	2/1	—
Glutamic acid	—	3/1	—	1/1	—
Ammonium acetate	1/0	—	—	—	—
Citrate	1/0	—	—	—	—
Blood (defibrinated)	—	5/16	—	—	19/51
Blood serum	12/10	11/11	1/9	1/0	10/59
Serum albumins	7/0	6/2	—	—	1/7
Gelatin	—	4/1	2/1	—	—
Peptone	3/0	8/7	1/14	0/1	1/3
Trypticase Soy	—	0/8	1/1	0/1	0/10
Shell extract	—	2/0	—	—	—
Glycoproteins	—	2/0	1/2	—	—
Mucin	—	1/0	—	—	—
Valinomycin	—	1/0	—	—	—
Gramicidin	—	1/0	—	—	—
Yeast extract	—	3/8	1/14	—	0/10
Malt extract	—	2/0	1/10	—	—
Skimmed milk	3/1	32/11	2/6	3/0	0/3
Egg yolk	1/0	1/0	—	1/0	—
Honey	—	2/0	—	—	—
Tween 80	—	3/1	0/1	—	—
Triton	—	1/0	—	—	—
Macrocydon	—	1/0	—	—	—
Mg^{2+}, Ca^{2+}	3/0	1/0	—	—	—
Na^{+}, K^{+}	1/0	1/0	—	—	—

ที่มา : Zdenek Hubálek (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสมดุลที่เหมาะสมในการใช้กลีเซอรอล 7.5 เปอร์เซนต์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์สำหรับสปอโรซิสของ *Eimiria tenella* คือ 100 นาที ที่ 37 °ซ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 7.5 เปอร์เซนต์ สามารถป้องกันสปอโรซิสเมื่อสมดุลเป็นเวลา 1–19 ชั่วโมง ได้ดีกว่าเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาที่สมดุลได้รับการยกเว้นต่อประสิทธิภาพในการซึมซับที่ต่ำของสปอโรซิส ส่วน *T. vaginalis* และ *P. chabaudi* ถูกทำให้สมดุลที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 °ซ เพื่อสามารถให้กลีเซอรอลซึมผ่านและป้องกันเซลล์ขณะที่อุณหภูมิสมดุลที่เหมาะสมสำหรับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ คือ 0°ซ อย่างไรก็ตามไม่มีผลกระทบต่อเวลาที่สมดุลต่ออัตราการรอดชีวิตของ *T. parvasporosites* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล 7.5 เปอร์เซนต์

เซลล์จำนวนมากโดยเฉพาะเซลล์ยูคาริโอตค่อนข้างจะไวต่อแรงดันออสโมติก ดังนั้นการซึมของไครโอโปรเทคแทนต์ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ควรจะเพิ่มเข้าไปและเคลื่อนย้ายจากซัสเพนชันทีละเล็กทีละน้อยเพื่อลดความเครียดจากแรงดันออสโมติก

2.5 ชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนต์ที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 ซูโครส

ซูโครส (sucrose) คือ ไดแซกคาไรด์ที่เกิดจากการสร้างพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของ α–D–กลูโคสกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของ β–D–ฟรักโทส ซูโครสมีลักษณะเป็นผลึก ละลายน้ำได้ดี พบในอ้อย ตาล มะพร้าว หัวบีท น้ำผึ้ง เป็นต้น

ซูโครสสามารถป้องกันไซโตโซลิคโปรตีน (cytosolic protein) ระหว่างการทำแห้ง โดยซูโครสจะเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนเกิดความคงทน ซูโครสจะไปแทนที่น้ำรอบๆ ขั้วที่เหลือภายในโครงสร้างโมเลกุล ช่วยรักษาโครงสร้างและฟังก์ชันของโปรตีนระหว่างการทำแห้ง ป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน โดยการฟอร์มตัวของพันธะไฮโดรเจน ซึ่งจะคงโครงสร้างที่สามของโปรตีนไว้ในขณะที่น้ำระเหยไป (Leslie et al., 1995) น้ำตาลสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อธรรมชาติหลายชนิด เช่น เมล็ด หรือละอองเกสร เมล็ดจะมีซูโครสและโอลิโกแซคคาไรด์อยู่ 10 – 20 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผสมกันของน้ำตาลสามารถยับยั้งการเกิดผลึกและช่วยให้เมล็ดรอดจากสภาพที่ไม่เอื้ออำนวย

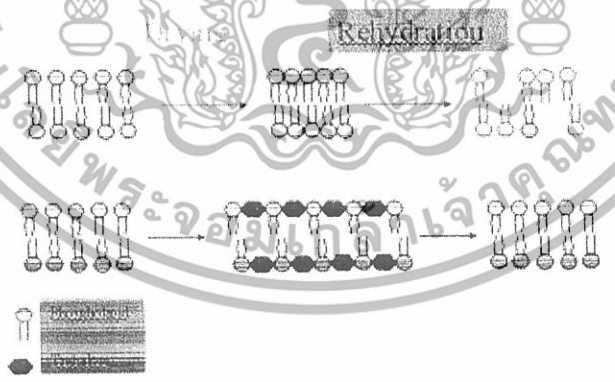
2.5.2 ทรีฮาโลส

ทรีฮาโลส (trehalose) สามารถเข้าไปภายในเซลล์เพื่อป้องกันโปรตีนระหว่างการทำแห้ง เซลล์ถูกรีซัสเพนชันในทรีฮาโลส 10 มิลลิโมล ที่ 28 °ซ และเพิ่มเป็น 0.43 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ของเซลล์ ขณะที่เซลล์ถูกรีซัสเพนชันที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของทรีฮา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โลสภายในเซลล์ และทรีฮาโลสสามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อย่างสมบูรณ์โดยป้องกันโครงสร้างของโปรตีนระหว่างการทำแห้งและการรีไฮเดรชัน (rehydration) ของน้ำ เพื่อให้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกการป้องกันเซลล์ของทรีฮาโลสจึงควรเข้าใจสิ่งที่เกิดขึ้นต่อเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างการทำแห้งและการรีไฮเดรชัน โดยขณะที่น้ำถูกเคลื่อนย้ายออกจากชั้นไขมันจะมีการเพิ่มแรงวัลเดอวาลล์ (van der waals interactions) ระหว่างสายโซ่เอคิล (acyl chains) ซึ่งจะทำให้ชั้นไบเลเยอร์ที่ถูกทำแห้งเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลที่อุณหภูมิห้อง และทำให้เกิดการแยกชั้นขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อไขมันที่ถูกทำให้แห้ง ถูกรีไฮเดรชันอาจจะก่อให้เกิดรูรั่วขึ้นได้ ทรีฮาโลสจึงสามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากการถูกทำลายจากกระบวนการทำแห้งและการรีไฮเดรชันโดยยังคงไขมันไว้ภายในชั้นไขมันที่อุณหภูมิห้อง ถึงแม้ว่าจะถูกทำแห้ง ทรีฮาโลสก็จะเข้าไปแทนที่ชั้นฟอสโฟไลปิดที่ถูกทำแห้งโดยสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกลุ่มที่มีขั้ว

ทรีฮาโลสและซูโครสสามารถป้องกันทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีหลักฐานการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็งแบบมีน้ำตาลและไม่มีน้ำตาล น้ำตาลจะป้องกันชั้นไบเลเยอร์ทั้งสองฝั่งของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเซลล์เริ่มเปลี่ยนสถานะจากการทำแห้งแบบแช่แข็ง เยื่อหุ้มเซลล์จะเริ่มรั่วและน้ำตาลจะเจือจางแล้วเข้าไปแทนที่ภายในเซลล์ เพราะการแช่แข็งแบบเร็วและการทำแห้ง จะทำให้น้ำตาลจำนวนมากเข้าไปในเซลล์ ทำให้สูญเสียกิจกรรมเมทาบอลิซึมน้อยมาก จึงสามารถป้องกันเซลล์ระหว่างการทำแห้งแบบแช่แข็งได้



ภาพที่ 2.3 กลไกการทำงานของทรีฮาโลส

ที่มา : http://www.netthandelen.no/visProdukt.aspx?id=90891

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) คือ ส่วนที่เป็นของเหลวใสๆและโปรตีนอัลบูมิน ที่ได้จากการทิ้งน้ำเลือดให้แข็งตัวก่อนแล้วนำไปปั่นแยกเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือด, เพลตเลต(platelet) และโปรตีนไฟบริน (protein fibrin) แยกออกจากน้ำเลือด

2.5.4 สคิมมิลค์

สคิมมิลค์ (skimmed milk) คือ นมที่แยกเอาไขมันออก มีสารอาหารครบเกือบทุกตัว ยกเว้นไขมัน และวิตามินที่ละลายในไขมัน หางนมเป็นแหล่งของโปรตีนจากสัตว์ที่ดีที่สุด มีคุณภาพสูง และมีแร่ธาตุพวกแคลเซียม และฟอสฟอรัสด้วย นอกจากนี้ยังมีแลคโตสอยู่เกือบเท่ากับที่มีอยู่ในน้ำนม ดังนั้นสคิมมิลค์จึงใช้เป็นอาหารที่ดีที่สุดของสัตว์อ่อน และยังเป็นแหล่งของโปรตีนนมและแร่ธาตุราคาถูกสำหรับมนุษย์ด้วย

โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และสคิมมิลค์จัดเป็นโปรตีนที่สามารถทำให้เกิดความคงทนต่อความเครียดทั้งจากการแช่แข็งและการไลโอฟิไลซ์ (Wang, 2000) เนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีน สามารถรักษาความคงทนของโปรตีนที่ไวต่อการแช่แข็งและการละลาย มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น (Allison et al., 1996) กลไกความคงทนของโปรตีนนั้นยังไม่ถูกอธิบาย (Wang, 2000) ผลของความคงทนที่ถูกกล่าวข้างต้นสำหรับโพลิเมอร์อาจอธิบายความคงทนของโปรตีนเอง Allison et al. (1996) ได้พยายามอธิบายผลของความเข้มข้นของโปรตีนในการป้องกันตัวมันเองระหว่างการแช่แข็ง ดังนี้

1. แรงผลักสเตอริก (steric repulsion) ของโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ติดกันอาจจะป้องกันการกางออกชั่วคราวของโปรตีนที่ความเข้มข้นสูงระหว่างการแช่แข็ง

2. ปริมาณโปรตีนอาจจะถูกจำกัดหรือทำให้เสื่อมลงที่พื้นผิวของผลึกน้ำแข็งระหว่างการแช่แข็ง เพราะข้อจำกัดของอินเตอร์เฟซ (interface)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์
2. หลอดแอมพูล (ampoule)
3. เครื่องไลโอฟิไลซ์ (lyophilizer)
4. ไมโครปิเปต (micropipette)
5. พาสเจอร์ปิเปต (pasturepipet)

3.1.2 สารเคมี

1. สคิมมิลค์ (skimmed milk)
2. ซูโครส (sucrose)
3. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin BSA)
4. ทรีฮาโลส (trehalose)
5. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ NB broth
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ NA
8. Peptone water 5 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	แบคทีเรีย
1	*Acetobacter aceti* AIKL 1001
2	*Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013
3	*Escherichia coli* AIKL 1014
4	*Escherichia coli* AIKL 1015
5	*Proteus vulgalis* AIKL 1019
6	*Pseudomonas* sp. AIKL 1020 (เชื้อควบคุม)
7	*Salmonella agona* AIKL 1021 (เชื้อควบคุม)
8	*Salmonella cerro* AIKL 1023
9	*Salmonella lexington* AIKL 1027
10	*Salmonella wandawort* AIKL 1031
11	*Staphylococcus aureus* AIKL 1034
12	*Staphylococcus aureus* AIKL 1039

3.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและอุปกรณ์ในการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อจากห้องปฏิบัติการมาทำการ streak ลงใน slant ที่เตรียมจากอาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อ ใน slant ที่เตรียมได้ มาทำการ cross streak ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อยู่เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวจากจานเพาะเชื้อมา streak ใน slant ที่เตรียมจากอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปใช้ในการทำเชื้อไลโอฟิไลซ์

หมายเหตุ

กรณีเป็นที่เชื้อจำพวก *A.aceti* จะใช้อาหาร GYE agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การเตรียมสารไครโอโปรเทคแทนต์

3.3.2.1 การเตรียมสคิมมิลค์ 20 เปอร์เซนต์

ชั่งสคิมมิลค์ผง 20 กรัม ผสมน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ครั้งที่ 1 ที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที (เมื่อได้เวลาให้นำสคิมมิลค์ออกจากเครื่อง autoclave ทันทีโดยค่อยๆ เปิดไล่ให้ความดันค่อยๆลดลงจนใกล้ 0 แล้วจึงเปิดฝาเครื่อง autoclave เอาสคิมมิลค์ออกมาโดยไม่ต้องรอให้อุณหภูมิลดลงเอง ไม่เช่นนั้น สคิมมิลค์จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้) ตั้งสคิมมิลค์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นเป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำสคิมมิลค์ไปเข้าเครื่อง autoclave อีกครั้งที่อุณหภูมิและเวลาเท่าเดิม ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปแช่ในตู้เย็นเพื่อเก็บรักษาไว้รอการนำไปใช้งานต่อไป

3.3.2.2 การเตรียมซูโครส 24 เปอร์เซนต์

ชั่งซูโครส 24 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายซูโครสที่ได้มาฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บแช่เย็นไว้ใช้งานต่อไป

3.3.2.3 การเตรียมซูโครส 20 เปอร์เซนต์ + โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 2 เปอร์เซนต์

ชั่งซูโครส 20 กรัม และโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมินที่ได้มาฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บแช่เย็นไว้ใช้งานต่อไป

3.3.2.4 การเตรียมทรีฮาโลส 20 เปอร์เซนต์

ชั่งทรีฮาโลส 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำทรีฮาโลสที่ได้มาฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บแช่เย็นไว้ใช้งานต่อไป

หมายเหตุ

สารไครโอโปรเทคแทนต์ทุกชนิดเป็น biochemical grade

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การเตรียมหลอดแอมพูล

ตัดกระดาษที่พิมพ์ชื่อเชื้อและวันที่ไว้แล้ว ให้มีขนาดเล็กพอที่จะใส่ลงไปในหลอดแอมพูลได้ นำกระดาษที่ตัดเสร็จแล้วใส่ลงในหลอดแอมพูล จากนั้นปิดปลายหลอดด้วยสำลีแล้วห่อด้วยกระดาษฟอล์ย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave จากนั้นนำไปอบเพื่อไล่ความชื้นที่ค้างอยู่ให้หมดก่อนนำไปใช้งาน

3.3.4 การเตรียมพาสเจอร์ปิเปต

นำพาสเจอร์ปิเปตมาอุดปลายด้วยสำลี แล้วห่อด้วยกระดาษฟอล์ยอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave จากนั้นนำไปอบเพื่อไล่ความชื้นที่ค้างอยู่ให้หมดก่อนนำไปใช้งาน

3.3.5 การผสมเชื้อกับไครโอโปรเทคแทนต์

เติม NB 5 มิลลิลิตรลงใน slant ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ผสมเชื้อให้เข้ากับ NB โดยใช้ vortex mixer ดูดซัสเพนชันที่ผสมเข้ากันดี 1 มิลลิลิตร และไครโอโปรเทคแทนต์ 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมเชื้อให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นดูดสารละลายซัสเพนชันเชื้อมา 0.15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแอมพูลที่เตรียมไว้แล้ว

3.4 การทำไลโอฟิไลซ์

3.4.1 การเตรียมเครื่องไลโอฟิไลซ์

เสียบปลั๊ก รอ 5 นาที จากนั้นเปิดสวิทส์ นำหลอดแอมพูลเปล่ามาเสียบเข้ากับแท่นเสียบ (มีทั้งหมด 48 ช่อง) กดปุ่ม MAN รอจนกราฟแสดงอุณหภูมิแสดงไฟสีเขียวขึ้นมาจนครบทุกช่อง (อุณหภูมิจะต้องมีค่าต่ำกว่า –40 °ซ) จากนั้นกดปุ่ม vacuum เครื่องจึงจะเริ่มทำงาน รอจนความดันลดลงจนทำให้กราฟของเครื่องแสดงค่าครบทุกช่อง จึงเริ่มทำการบรรจุตัวอย่างลงเครื่องได้ (ความดันมากที่สุดที่กราฟจะแสดงผลครบทุกช่อง คือ 133×10^{-3} มิลลิบาร์)

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างลงหลอดแอมพูล

นำไครโอโปรเทคแทนต์มาใส่ลงใน slant ที่มีเชื้ออายุ 24–36 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อ ตีเชื้อบนผิว slant ให้กระจายลงในไครโอโปรเทคแทนต์ให้ผสมเข้ากันอย่างสม่ำเสมอ ดูดเชื้อที่ผสมกับไครโอโปรเทคแทนต์ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงในหลอดแอมพูลโดยใช้พาสเจอร์ปิเปต จากนั้นปิดหลอดด้วยจุกสำลี นำไปทำให้แข็งโดยใช้แอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซนต์ (ที่อุณหภูมิ –30 °ซ แช่เชื้อไว้ประมาณ 2 นาที) จากนั้นนำหลอดเชื้อที่แข็งแล้วใส่เครื่องไลโอฟิไลซ์ (ใส่แทนหลอดเปล่า) ก่อนใส่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ละหลอดต้องรอให้ vacuum $\leq$ ขนาด 133x 10^{-3} มิลลิบาร์ รอให้เชื้อแห้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง (สังเกตโดยดู vacuum คงที่และมีค่าใกล้เคียงกับตอนที่ใส่หลอดแอมพูลเปล่า) ดึงหลอดออกมา 2–3 หลอด แล้วกด vacuum ออกแล้วดึงหลอดทั้งหมดออกมาดอด นำหลอดที่ดอดแล้วมาใส่แท่นเสียบทุกรู กดให้ vacuum ทำงานรอจน vacuum $\leq$ ขนาด 133x 10^{-3} มิลลิบาร์ แล้วจับเวลาประมาณ ½–1 ชั่วโมง ทำการปิดหลอด แล้วนำหลอดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2°ซ) เป็นเวลา 4 เดือนและ 8 เดือน

3.5 การตรวจหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิต

นำหลอดแอมพูลที่บรรจุเชื้อแบคทีเรียไลโอฟิไลซ์จากที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็นมาตัดหลอดเพื่อนำเชื้อมาตรวจวิเคราะห์ นำเชื้อแบคทีเรียไลโอฟิไลซ์ ใส่ลงใน NA Broth 9.85 มิลลิลิตร แล้วนำไป vortex mixer จากนั้นนำมาเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นที่ 10^{-6}, 10^{-7}, และ10^{-8} และนำไป pour plate ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อย่างละ 2 plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่พบและนำมาคำนวณเป็น ค่า cfu/ml

3.6 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทำไลโอฟิไลซ์มาทำตามวิธีการทำไลโอฟิไลซ์ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น โดยใช้สคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์แล้วมาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 0, 4 และ 8 เดือน โดยวิธี pour plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น แล้วคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตจาก

อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

$$\text{หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียก่อนผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

$$\text{หลังจากการเก็บรักษา} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการเก็บรักษา (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทำไลโอฟิไลซ์มาทำตามวิธีการทำไลโอฟิไลซ์ที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น โดยใช้ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์แล้วมาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 0, 4 และ 8 เดือน โดยวิธี pour plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น แล้วคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตจาก

อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

$$\text{หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียก่อนผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

$$\text{หลังจากการเก็บรักษา} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการเก็บรักษา (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

การทดลองที่ 3 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ทรีฮาโลสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทำไลโอฟิไลซ์มาทำตามวิธีการทำไลโอฟิไลซ์ที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น โดยใช้ทรีฮาโลสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์แล้วมาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 0, 4 และ 8 เดือน โดยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น แล้วคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตจาก

อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

$$\text{หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียก่อนผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

$$\text{หลังจากการเก็บรักษา} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการเก็บรักษา (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

การทดลองที่ 4 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมินเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทำไลโอฟิไลซ์มาทำตามวิธีการไลโอฟิไลซ์ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น โดยใช้ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมินเป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์ นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์แล้วมาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 0, 4 และ 8 เดือน โดยวิธี pour plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น แล้วคำนวณหา

อัตราการรอดชีวิตจาก

อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

$$\text{หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียก่อนผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

$$\text{หลังจากการเก็บรักษา} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการเก็บรักษา (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

การทดลองที่ 5 คาดคะเนอายุการเก็บของแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์

นำข้อมูลการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ 4 ชนิด ที่เก็บรักษา 0, 4 และ 8 เดือน มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับเวลา จากนั้นลากเส้นแนวโน้มหาเวลาในการเก็บรักษาแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้โปรแกรมเอ็กซ์เซลล์ (excel)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

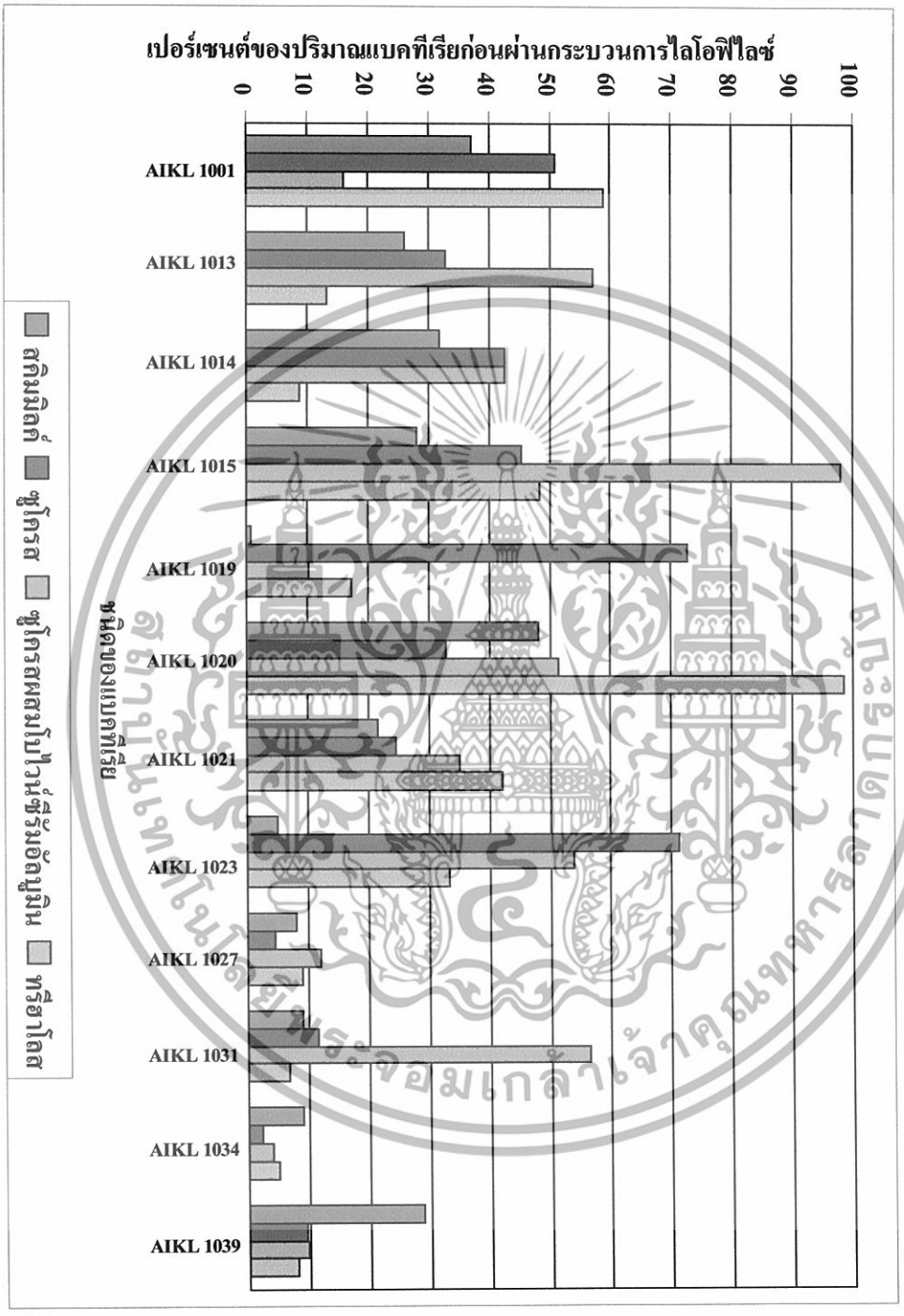
4.1 ผลของไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น

4.1.1 ผลของไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์

จากการศึกษาผลของไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ในระหว่างกระบวนการไลโอฟิไลซ์ โดยมีเชื้อ *Pseudomonas* sp. AIKL 1020 และ *Salmonella agona* AIKL 1021 เป็นเชื้อควบคุม ได้ผลดังนี้

จากภาพที่ 4.1 ผลของไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ พบว่าซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน สามารถช่วยป้องกันการรอดชีวิตของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการไลโอฟิไลซ์ได้มากที่สุด 5 สายพันธุ์ คือ *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013, *Escherichia coli* AIKL 1014, *Escherichia coli* AIKL 1015, *Salmonella lexington* AIKL 1027 และ *Salmonella wandawort* AIKL 1031 รองลงมาคือ ทรีฮาโลส สามารถป้องกันการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter aceti* AIKL 1001, *Pseudomonas* sp. AIKL 1020 และ *Salmonella agona* AIKL 1021, ซูโครส 3 สายพันธุ์ คือ *Proteus vulgalis* AIKL 1019, *Salmonella cerro* AIKL 1023 และ *Escherichia coli* AIKL 1015 และสคิมมิลค์ สามารถป้องกันการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* AIKL 1034 และ *Staphylococcus aureus* AIKL 1039 จากผลดังกล่าวการที่ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมินสามารถช่วยป้องกันเซลล์ให้มีชีวิตรอดในระหว่างกระบวนการไลโอฟิไลซ์ได้ดี เนื่องมาจากการใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์สองตัวผสมกันจะทำให้ประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์มีมากขึ้น และจากการทดลองของเกรียงไกรและคณะพบว่าเชื้อแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองมีชีวิตรอดน้อยเมื่อใช้สคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



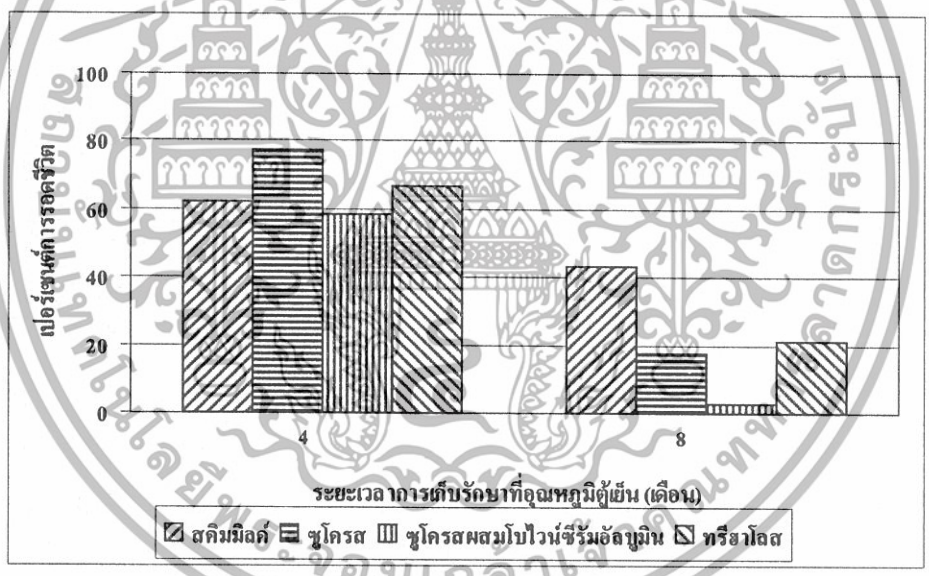
ภาพที่ 4.1 การรอดชีวของแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกส์ที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ในสารป้องกันการแข็งตัวชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลของไครโอโปรเทคแทนต์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน

จากการทดลองการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิตู้เย็น แล้วทำการตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอด ที่ 4 และ 8 เดือน และคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ 4 และ 8 เดือน โดยให้จำนวนเชื้อหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์เป็นเปอร์เซนต์ แล้วเปรียบเทียบหาไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ได้ผลดังนี้

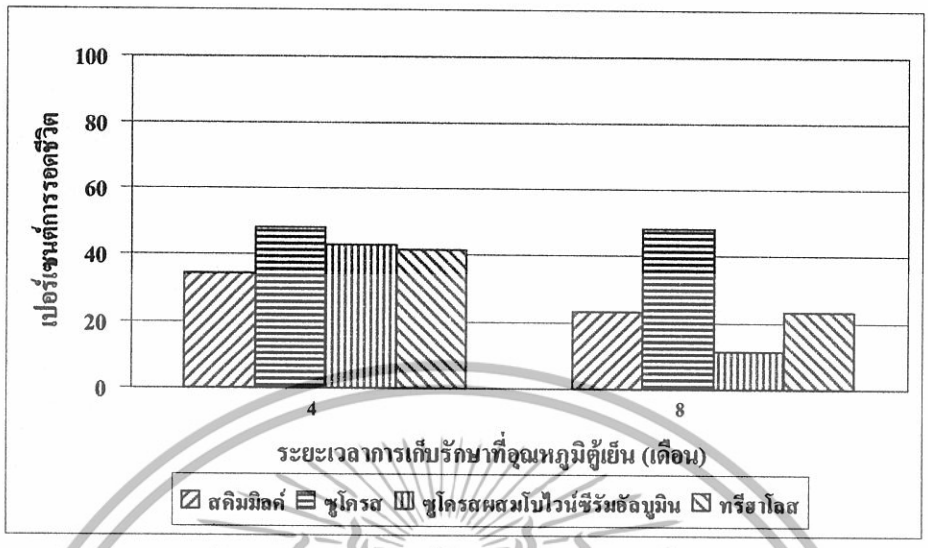
จากภาพที่ 4.2 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้ สคิมมิลค์ ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมา คือ ซูโครส, ทรีฮาโลส และน้อยที่สุดคือ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน



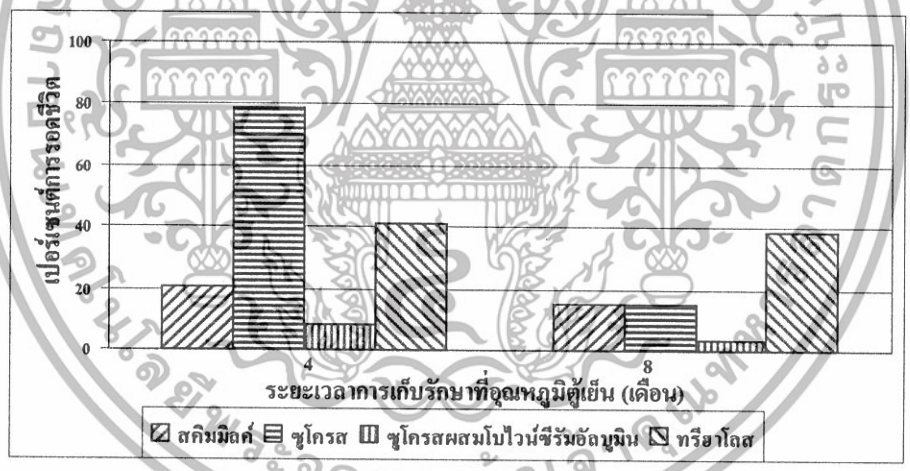
ภาพที่ 4.2 การรอดชีวิตของ *Acetobacter aceti* AIKL 1001 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.3 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าซูโครสทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็น ทรีฮาโลส, สคิมมิลค์ และน้อยที่สุดคือ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



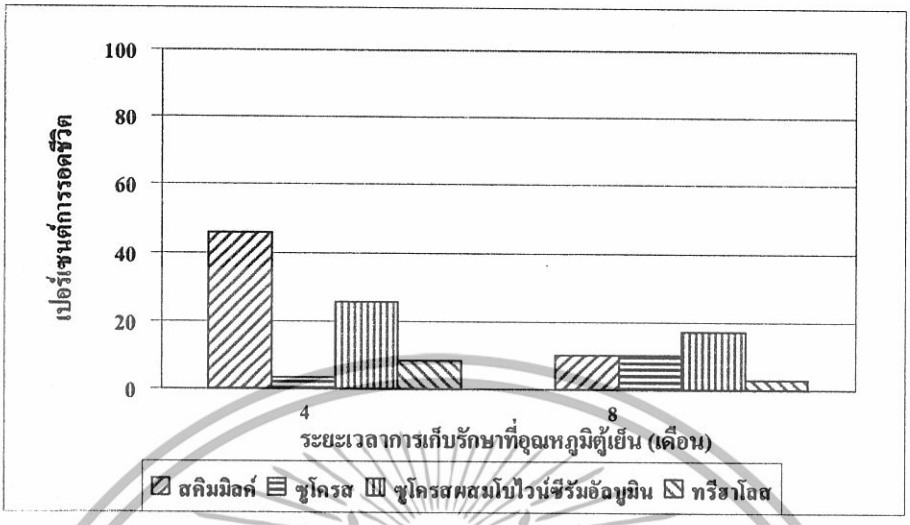
ภาพที่ 4.3 การรอดชีวิตของ *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด



ภาพที่ 4.4 การรอดชีวิตของ *Escherichia coli* AIKL 1014 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.4 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Escherichia coli* AIKL 1014 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้ ทรียาโลส ทำให้เชื้อ *Escherichia coli* AIKL 1014 มีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาคือ สคิมมิลค์, ซูโครส และน้อยที่สุดคือ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



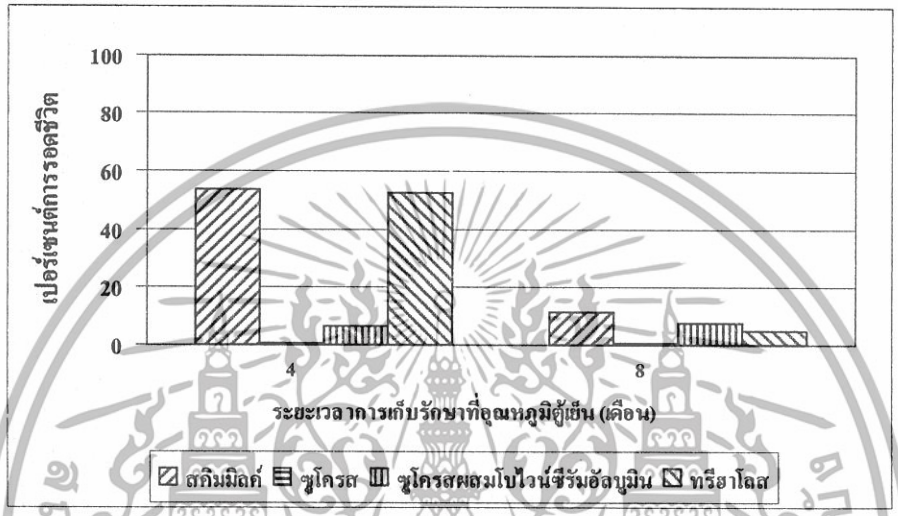
ภาพที่ 4.5 การรอดชีวิตของ *Escherichia coli* AIKL 1015 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.5 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่า การใช้ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็น สคิมมิลค์, ทรีฮาโลส และน้อยที่สุดคือ ซูโครส

ภาพที่ 4.6 การรอดชีวิตของ *Proteus vulgalis* AIKL 1019 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.6 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Proteus vulgalis* AIKL 1019 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้สคิมมิลค์ ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นทรีฮาโลส, ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมินและน้อยที่สุดคือซูโครส

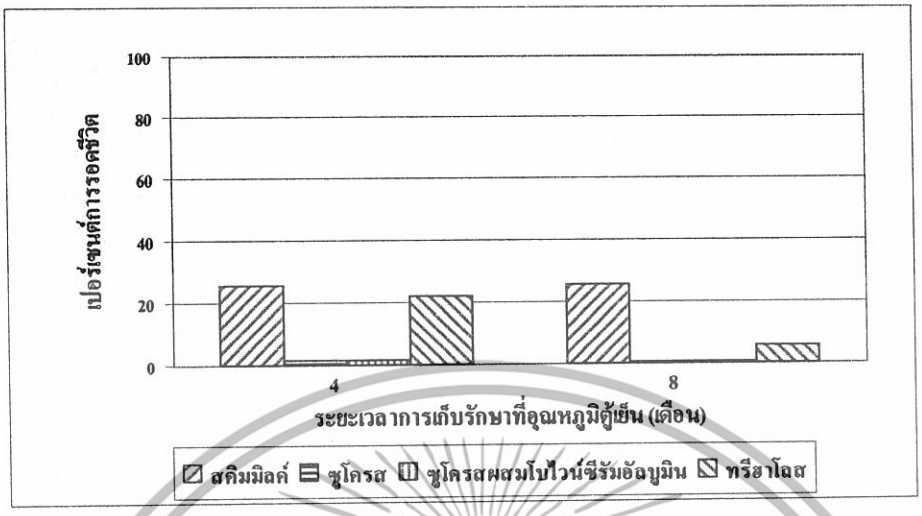


ภาพที่ 4.7 การรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. AIKL 1020 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.7 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Pseudomonas* sp. AIKL 1020 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้สคิมมิลค์ ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นทรีฮาโลส, ซูโครส ผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และน้อยที่สุด คือ ซูโครส

จากภาพที่ 4.8 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Salmonella agona* AIKL 1021 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้สคิมมิลค์ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นทรีฮาโลส, ซูโครส และน้อยที่สุด คือ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



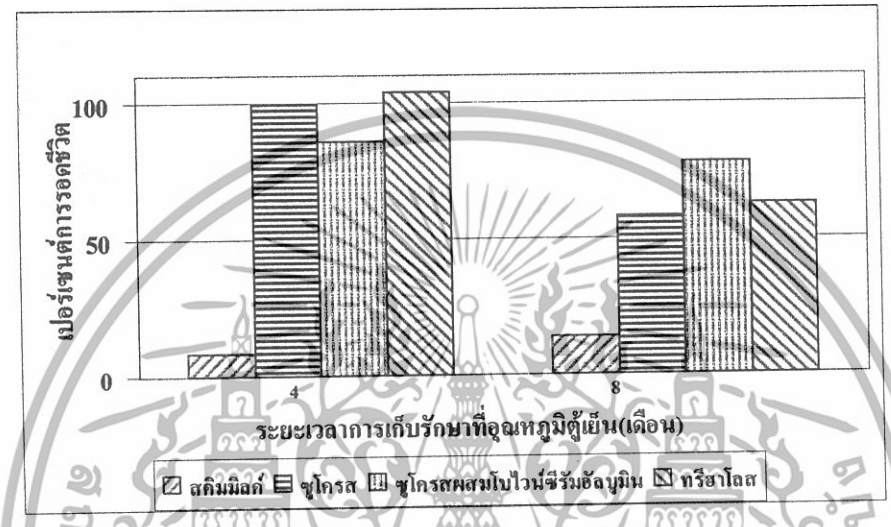
ภาพที่ 4.8 การรอดชีวิตของ *Salmonella agona* AIKL 1021 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

ภาพที่ 4.9 การรอดชีวิตของ *Salmonella cerro* AIKL 1023 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือนเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.9 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Salmonella cerro* AIKL 1023 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้สคิมมิลค์ ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นทรีฮาโลส, ซูโครส และน้อยที่สุดคือ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.10 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Salmonella lexington* AIKL 1027 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นทรีฮาโลส, ซูโครส และน้อยที่สุด คือ สคิมมิลค์



ภาพที่ 4.10 การรอดชีวิตของ *Salmonella lexington* AIKL 1027 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

ภาพที่ 4.11 การรอดชีวิตของ *Salmonella wandawort* AIKL 1031 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

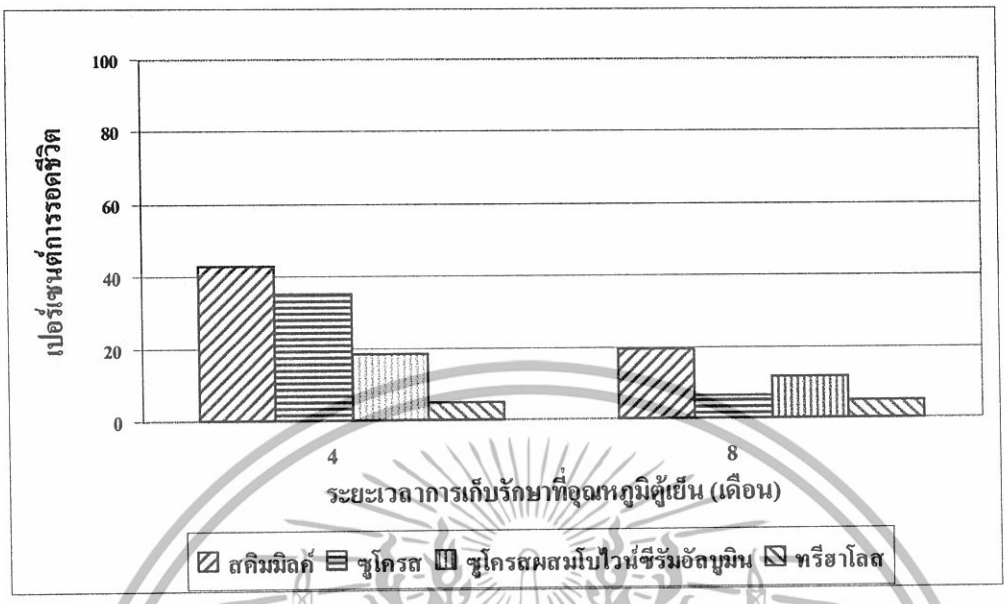
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.11จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Salmonella wandawort* AIKL 1031 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้สคิมมิลค์ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นซูโครส, ทรีฮาโลส และน้อยที่สุด คือ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

ภาพที่ 4.12 การรอดชีวิตของ *Staphylococcus aureus* AIKL 1034 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.12 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Staphylococcus aureus* AIKL 1034 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้สคิมมิลค์ ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน,ซูโครส และน้อยที่สุด คือ ทรีฮาโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 การรอดชีวิตของ *Staphylococcus aureus* AIKL 1039 หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4.13 จากการสังเกตการลดลงของเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ *Staphylococcus aureus* AIKL 1039 ในช่วง 4 และ 8 เดือน พบว่าการใช้ ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นมากที่สุด รองลงมาเป็นสคิมมิลค์,ทรียาโลส และน้อยที่สุด คือ ซูโครส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

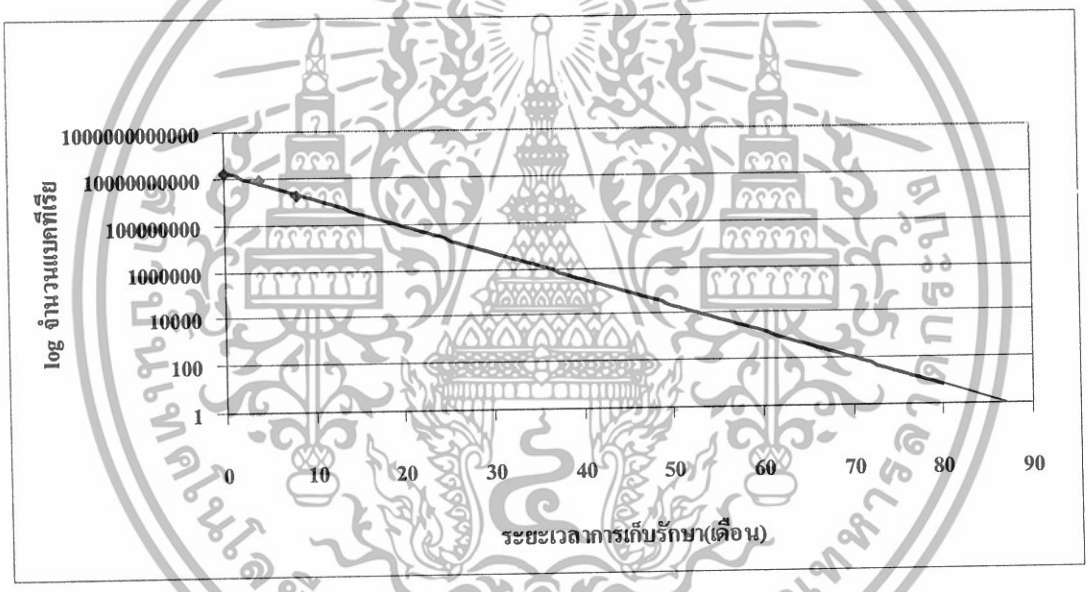
ตารางที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรียและไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

ลำดับ	แบคทีเรีย	ไครโอโปรเทคแทนต์ที่ทำให้เชื้อรอดชีวิตหลังไลโอฟิไลซ์มากที่สุด	ไครโอโปรเทคแทนต์ที่ทำให้เชื้อรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษามากที่สุด
1	*Acetobacter aceti* AIKL 1001	ทรีฮาโลส	สคิมมิลค์
2	*Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	ซูโครส
3	*Escherichia coli* AIKL 1014	ซูโครส และซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	ทรีฮาโลส
4	*Escherichia coli* AIKL 1015	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน
5	*Proteus vulgalis* AIKL 1019	ซูโครส	สคิมมิลค์
6	*Pseudomonas* sp. AIKL 1020	ทรีฮาโลส	สคิมมิลค์
7	*Salmonella agona* AIKL 1021	ทรีฮาโลส	สคิมมิลค์
8	*Salmonella cerro* AIKL 1023	ซูโครส	สคิมมิลค์
9	*Salmonella lexington* AIKL 1027	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน
10	*Salmonella wandawort* AIKL 1031	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	สคิมมิลค์
11	*Staphylococcus aureus* AIKL 1034	สคิมมิลค์	สคิมมิลค์
12	*Staphylococcus aureus* AIKL 1039	สคิมมิลค์	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคาดคะเนอายุการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม

จากการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน แล้วนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่ 0, 4 และ 8 เดือน นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต กับเวลา (เลือกผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม) แล้วลากเส้นแนวโน้มคาดคะเนอายุการเก็บรักษา พบว่า แบคทีเรียมีอายุการเก็บรักษาโดยเฉลี่ยประมาณ 7–10 ปี



ภาพที่ 4.14 การคาดคะเนอายุการเก็บรักษา *Pseudomonas* sp. AIKL 1020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 อายุการเก็บรักษาแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม

ลำดับที่	แบคทีเรีย	ไครโอโปรแทคแทนต์ที่เหมาะสม	อายุการเก็บรักษาของแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรแทคแทนต์ที่เหมาะสม (ปี)
1	*Acetobacter aceti* AIKL 1001	สคิมมิลค์	7.3
2	*Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013	ซูโครส	7.4
3	*Escherichia coli* AIKL 1014	สคิมมิลค์	10
4	*Escherichia coli* AIKL 1015	สคิมมิลค์	7.3
5	*Proteus vulgalis* AIKL 1019	ทรีฮาโลส	7.5
6	*Pseudomonas* sp. AIKL 1020	สคิมมิลค์	7.25
7	*Salmonella agona* AIKL 1021	สคิมมิลค์	8.3
8	*Salmonella cerro* AIKL 1023	ทรีฮาโลส	7.1
9	*Salmonella lexington* AIKL 1027	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	10
10	*Salmonella wandawort* AIKL 1031	สคิมมิลค์	7.5
11	*Staphylococcus aureus* AIKL 1034	สคิมมิลค์	9.2
12	*Staphylococcus aureus* AIKL 1039	สคิมมิลค์	8.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง ผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ 4 ชนิด คือ สคิมมิลค์, ซูโครส, ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และทรีฮาโลส ต่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์พบว่า สารไครโอโปรเทคแทนต์แต่ละชนิดมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นแตกต่างกันทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยสคิมมิลค์เหมาะสมสำหรับ *Acetobacter aceti* AIKL 1001, *Escherichia coli* AIKL 1014, *Escherichia coli* AIKL 1015, *Pseudomonas* sp. AIKL 1020, *Salmonella agona* AIKL 1021, *Salmonella wandawort* AIKL 1031, *Staphylococcus aureus* AIKL 1034 และ *Staphylococcus aureus* AIKL 1039 ซูโครสเหมาะสมสำหรับ *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013 ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมินเหมาะสมสำหรับ *Salmonella lexington* AIKL 1027 ทรีฮาโลสเหมาะสมสำหรับ *Proteus vulgalis* AIKL 1019 และ *Salmonella cerro* AIKL 1023 จากผลข้างต้นพบว่า การใช้ซูโครส, ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และทรีฮาโลสไม่สามารถช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตรอดหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้ดีกว่าการใช้สคิมมิลค์ ยกเว้น *Corynebacterium glutamicum* AIKL 1013, *Salmonella lexington* AIKL 1027 และ *Proteus vulgalis* AIKL 1019 กับ *Salmonella cerro* AIKL 1023 พบว่าการใช้ซูโครส, ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และทรีฮาโลส ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าการใช้สคิมมิลค์ ตามลำดับ และพบว่าไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ทำให้การรอดชีวิตหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นแตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรีย ควรคำนึงถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนต์ รวมถึงราคาของสารไครโอโปรเทคแทนต์ และเมื่อคาดคะเนอายุการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 สายพันธุ์โดยใช้สารไครโอโปรเทคแทนต์ที่เหมาะสม พบว่ามีอายุการเก็บรักษาอยู่ในช่วง 7 ถึง 10 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

ในระหว่างกระบวนการไลโอฟิไลซ์ ขั้นตอนการเสียบหลอดแอมพูล เพื่อระเหิดซัสเพนชันเชื้อที่อยู่ในสภาพเยือกแข็ง ควรให้อุณหภูมิภายในห้องปฏิบัติการต่ำและคงที่ เพื่อป้องกันซัสเพนชันเชื้อละลายและระเหยออกจากหลอดแอมพูลจนหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ . 2544. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ (Preservative technique of microorganisms).** กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ [online] เข้าถึงได้จาก : www.swu.ac.th/royal/book2/b2c11t3.html (06/03/2007)

นิจ สุรนันท์. "**ส่วนประกอบของเลือด**". [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.school.net.th/library/create-web/10000/science/10000-8134.html

นงลักษณ์ สิทธิเจริญชัย. "**ทรีฮาโลสหรือน้ำตาลเห็ด**". [online]. เข้าถึงได้จาก : http://valor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/REP-13/R_404652001-13.doc

บุญรอด วงษ์สวาท. "**ซูโครส (sucrose)**". [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.promma.ac.th/chemistry/Biomolecule/Biomolecule032.htm

เอกดนัย กอกิมพงษ์. "**เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง**". [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thaiscience.com/lab_vol/p30/freeze%20dryer.asp

Cleland , D.,Krader,P.,Mccree,C.,Tang, J.and Emerson,D., 2004. **Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. Journal of Microbiological Methods.** (58) :31–38

Hubalek, Z., 2003. **Protectant used in the cryopreservation of microorganisms.** Cryobiology (46) : 205–299

Samuel B. Leslie, Eitan Israeli, Bruce Lighthart, John H. Crowe and Lois M. Crowe, 1995. **Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.** American society for microbiology (61): 3592 –3597

Netthandelen. "**Trehalose**"[online].*available* : http://www.netthandelen.no/visProdukt.aspx?id=90891

Thailand The Royal Chitralada Projects Home Page. "**Skim milk**" [online]. *available* : http://www.kanchanapisek.or.th/kp1/data/37/che_032.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงจำนวนแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ และเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก1 จำนวนแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน

แบคทีเรีย	ไครโอโปรเทคแทนต์	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)			
		ก่อนผ่านกรการไลโอฟิไลซ์	หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์	หลังการเก็บรักษา 4 เดือน	หลังการเก็บรักษา 8 เดือน
Acetobacter aceti AIKL 1001	สคิมมิลค์	2.56×10^{6}	9.50×10^{6}	1.00×10^{10}	5.00×10^{3}
	ซูโครส	3.96×10^{6}	2.01×10^{6}	2.00×10^{10}	3.50×10^{5}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	2.67×10^{7}	4.27×10^{6}	2.00×10^{10}	1.13×10^{5}
	ทรีฮาโลส	2.36×10^{6}	9.30×10^{5}	1.00×10^{10}	2.92×10^{5}
Corynebacterium glutamicum AIKL 1013	สคิมมิลค์	1.88×10^{10}	4.90×10^{8}	1.67×10^{8}	1.15×10^{8}
	ซูโครส	2.73×10^{10}	9.00×10^{8}	4.30×10^{8}	4.30×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	3.26×10^{9}	1.86×10^{9}	8.10×10^{8}	2.14×10^{8}
	ทรีฮาโลส	2.56×10^{9}	3.40×10^{8}	1.40×10^{8}	0.80×10^{8}
Escherichia coli AIKL 1014	สคิมมิลค์	3.12×10^{9}	9.90×10^{8}	2.05×10^{8}	1.50×10^{8}
	ซูโครส	1.97×10^{9}	8.40×10^{8}	6.60×10^{8}	1.30×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	3.36×10^{9}	6.10×10^{8}	1.20×10^{8}	0.52×10^{8}
	ทรีฮาโลส	3.8×10^{8}	3.40×10^{8}	1.41×10^{8}	1.32×10^{8}
Escherichia coli AIKL 1015	สคิมมิลค์	7.96×10^{8}	2.23×10^{8}	1.02×10^{8}	2.29×10^{8}
	ซูโครส	5.08×10^{8}	2.30×10^{8}	0.80×10^{8}	0.24×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	7.19×10^{8}	7.05×10^{8}	1.78×10^{8}	1.20×10^{8}
	ทรีฮาโลส	7.86×10^{8}	3.75×10^{8}	0.32×10^{8}	0.13×10^{8}
Proteus vulgalis AIKL 1019	สคิมมิลค์	1.68×10^{10}	1.33×10^{8}	0.80×10^{8}	0.28×10^{8}
	ซูโครส	1.51×10^{10}	1.10×10^{10}	2.06×10^{9}	4.10×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	2.87×10^{10}	2.94×10^{9}	2.20×10^{8}	0.92×10^{8}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก1 (ต่อ) จำนวนแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน

แบคทีเรีย	ไครโอโปรเทคแทนต์	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)			
		ก่อนผ่านกระการไลโอฟิไลซ์	หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์	หลังการเก็บรักษา 4 เดือน	หลังการเก็บรักษา 8 เดือน
Proteus vulgalis AIKL 1019	ทรีฮาโลส	1.46×10^{10}	2.54×10^{9}	3.80×10^{8}	2.63×10^{8}
Pseudomonas sp. AIKL 1020	สคิมมิลค์	3.22×10^{10}	1.55×10^{10}	8.36×10^{9}	1.76×10^{9}
	ซูโครส	6.36×10^{10}	2.09×10^{10}	1.20×10^{8}	0.68×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	2.47×10^{10}	1.27×10^{10}	8.50×10^{8}	9.40×10^{8}
	ทรีฮาโลส	1.46×10^{10}	1.44×10^{10}	–	7.25×10^{8}
Salmonella agona AIKL 1021	สคิมมิลค์	4.96×10^{10}	1.08×10^{10}	2.79×10^{19}	2.77×10^{9}
	ซูโครส	4.00×10^{10}	9.80×10^{9}	1.50×10^{8}	0.62×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	2.42×10^{10}	8.50×10^{9}	1.20×10^{8}	0.34×10^{8}
	ทรีฮาโลส	3.58×10^{10}	1.50×10^{10}	3.35×10^{19}	8.65×10^{8}
Salmonella cerro AIKL 1023	สคิมมิลค์	3.69×10^{10}	1.82×10^{9}	2.36×10^{8}	2.58×10^{8}
	ซูโครส	1.96×10^{10}	1.40×10^{10}	4.85×10^{8}	2.86×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	3.22×10^{10}	1.73×10^{10}	1.56×10^{8}	0.57×10^{8}
	ทรีฮาโลส	2.86×10^{10}	9.50×10^{9}	1.06×10^{9}	8.10×10^{8}
Salmonella lexington AIKL 1027	สคิมมิลค์	1.57×10^{10}	1.36×10^{9}	1.08×10^{8}	1.76×10^{8}
	ซูโครส	1.87×10^{10}	8.65×10^{8}	8.75×10^{8}	5.03×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	1.57×10^{10}	1.49×10^{9}	1.90×10^{9}	1.64×10^{9}
	ทรีฮาโลส	1.42×10^{10}	1.30×10^{10}	1.35×10^{19}	8.20×10^{9}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก1 (ต่อ) จำนวนแบคทีเรียเมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน

แบคทีเรีย	ไครโอโปรเทคแทนต์	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/ml)			
		ก่อนผ่านกรการไลโอฟีไลซ์	หลังผ่านการไลโอฟีไลซ์	หลังการเก็บรักษา 4 เดือน	หลังการเก็บรักษา 8 เดือน
Salmonella wandawort AIKL 1031	สคิมมิลค์	1.33×10^{9}	1.03×10^{8}	1.20×10^{8}	1.06×10^{8}
	ซูโครส	1.93×10^{9}	2.21×10^{8}	2.04×10^{8}	0.48×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	1.70×10^{9}	9.60×10^{8}	0.82×10^{8}	0.53×10^{8}
	ทรีฮาโลส	2.10×10^{9}	1.45×10^{8}	0.10×10^{8}	0.02×10^{8}
Staphylococcus aureus AIKL 1034	สคิมมิลค์	2.74×10^{10}	2.47×10^{9}	1.21×10^{9}	1.08×10^{9}
	ซูโครส	3.67×10^{10}	8.75×10^{8}	1.74×10^{8}	2.25×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	2.41×10^{10}	9.60×10^{8}	2.87×10^{8}	2.17×10^{8}
	ทรีฮาโลส	3.88×10^{10}	1.91×10^{9}	3.36×10^{8}	4.05×10^{8}
Staphylococcus aureus AIKL 1039	สคิมมิลค์	9.32×10^{9}	2.69×10^{9}	1.16×10^{9}	5.17×10^{8}
	ซูโครส	1.02×10^{10}	9.50×10^{8}	3.42×10^{8}	0.60×10^{8}
	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	9.20×10^{9}	9.10×10^{8}	1.64×10^{8}	1.05×10^{8}
	ทรีฮาโลส	1.04×10^{10}	8.40×10^{8}	1.45×10^{8}	1.48×10^{8}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก2 ผลของสารไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์

ชนิดของแบคทีเรีย	การรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์เมื่อใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ (เปอร์เซนต์ของจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียก่อนผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์)			
	สคิมมิลค์	ซูโครส	ซูโครสผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	ทรีฮาโลส
Acetobacter aceti AIKL 1001	37.05	50.76	15.99	58.90
Corynebacteium glutamicum AIKL 1013	26.10	32.90	57.10	13.33
Escherichia coli AIKL 1014	31.74	42.65	42.65	8.80
Escherichia coli AIKL 1015	28.06	45.32	98.02	48.47
Proteus valgalis AIKL 1019	0.79	72.75	10.23	17.39
Pseudomonas sp. AIKL 1020	48.14	32.88	51.26	98.6
Salmonella agona AIKL 1021	21.67	24.51	35.12	42.08
Salmonella cerro AIKL 1023	4.93	71.17	53.80	33.22
Salmonella lexington AIKL 1027	8.04	4.62	12.08	9.12
Salmonella wandawort AIKL 1031	9.00	11.46	56.33	6.89
Staphylococcus aureus AIKL 1034	9.03	2.38	3.97	4.92
Staphylococcus aureus AIKL 1039	28.9	9.4	9.81	8.06

หมายเหตุ

$$\text{อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียก่อนผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก3 การรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์โดยใช้ไครโอโปรเทคแทนต์ชนิดต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน

ชนิดของแบคทีเรีย	การรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 4 และ 8 เดือน (เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์)							
	4 เดือน				8 เดือน			
	สกิมมิลค์	ซูโครส	ซูโครสผสมโมโนซัมมีนไกลซีน	ทรีฮาโลส	สกิมมิลค์	ซูโครส	ซูโครสผสมโมโนซัมมีนไกลซีน	ทรีฮาโลส
A. aceti AIKL 1001	62.21	77.60	58.35	66.91	43.16	17.42	2.65	21.00
C. glutamicum AIKL1013	34.18	48.02	42.94	41.56	23.45	48.02	11.49	23.44
E. coli AIKL 1014	21.01	78.62	8.56	41.14	15.12	15.45	3.59	38.64
E. coli AIKL 1015	45.69	3.35	25.30	8.40	10.33	10.19	17.03	2.62
P. valgalis AIKL 1019	60.76	18.72	7.53	14.95	21.52	3.73	3.13	10.35
Psuedomonas sp. AIKL 1020	53.93	0.58	6.71	52.74	11.36	0.33	7.43	5.04
S. agona AIKL 1021	25.66	1.55	1.40	22.27	25.75	0.63	0.40	5.75
S. cerro AIKL 1023	12.98	3.47	0.89	11.16	14.18	2.05	0.33	8.51
S. lexington AIKL 1027	8.58	99.57	86.34	103.73	13.97	58.23	78.23	63.05
S. wandawort AIKL1031	88.44	92.32	0.85	7.11	85.89	21.47	5.52	1.58
Stap. aureus AIKL 1034	48.77	19.87	30.03	17.68	43.74	25.63	22.67	21.14
Stap. aureus AIKL 1039	42.91	35.11	18.14	4.81	19.20	6.28	11.62	4.91

หมายเหตุ

$$\text{อัตราการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการเก็บรักษา (cfu/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังผ่านการไลโอฟิไลซ์ (cfu/ml)}} \times 100$$

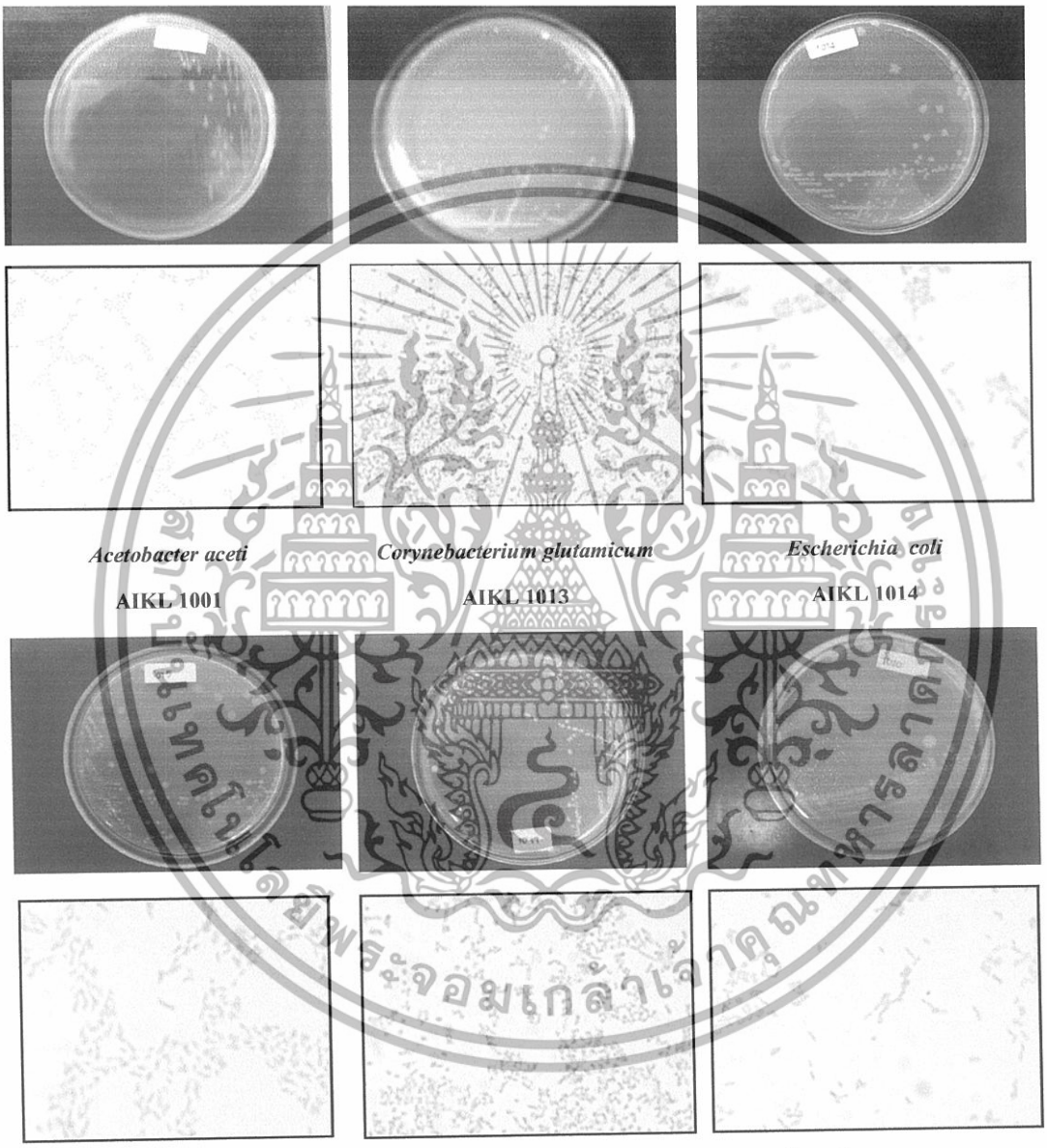
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา โดยทำการการย้อมแกรม แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000× อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ คือ NA ยกเว้น *A. aceti* AIKL 1001 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar



Acetobacter aceti
AIKL 1001

Corynebacterium glutamicum
AIKL 1013

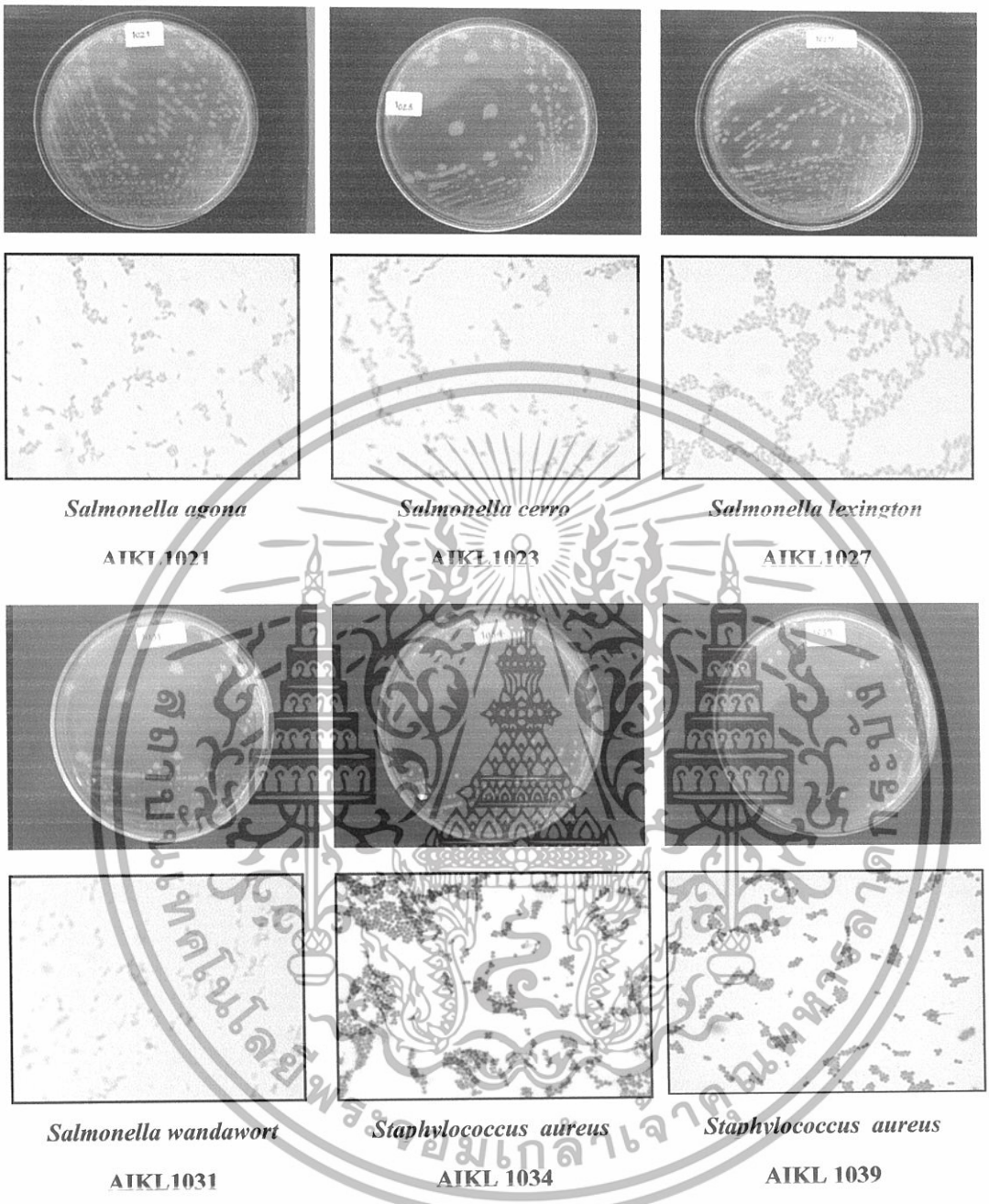
Escherichia coli
AIKL 1014

Escherichia coli
AIKL1015

Proteus vulgalis
AIKL1019

***Pseudomonas* sp.**
AIKL1020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Salmonella agona

AIKL 1021

Salmonella cerro

AIKL 1023

Salmonella lexington

AIKL 1027

Salmonella wandawort

AIKL1031

Staphylococcus aureus

AIKL 1034

Staphylococcus aureus

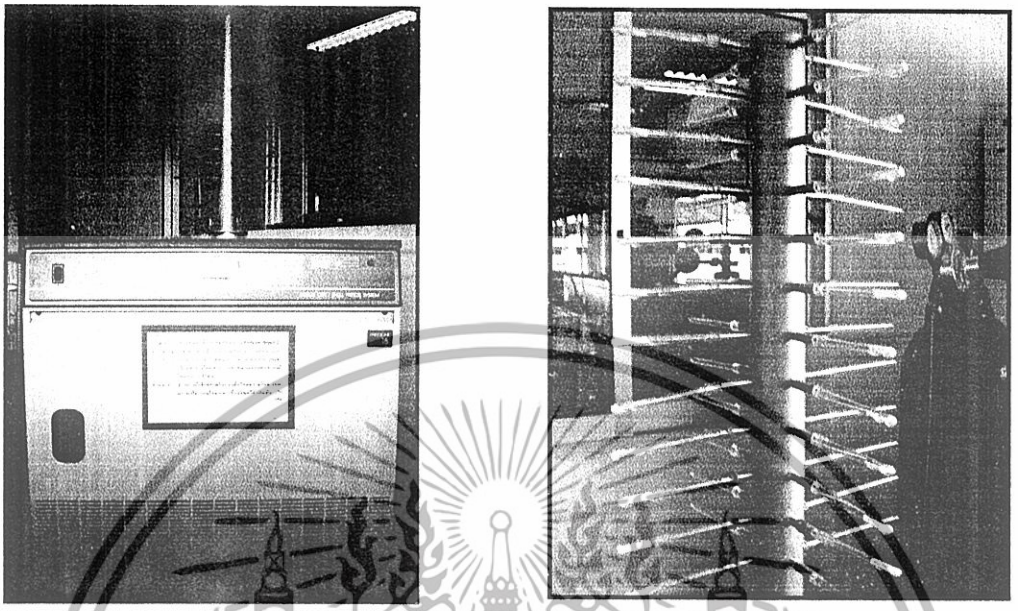
AIKL 1039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

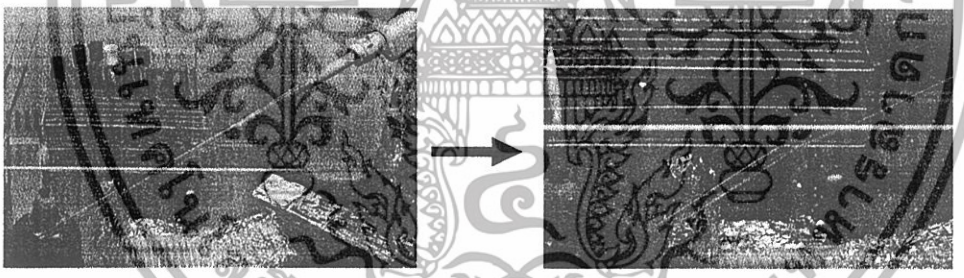
ภาคผนวก ค

ภาพแสดงการทำไลโอฟิไลซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

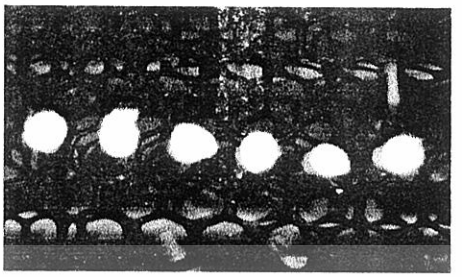


ภาพผนวกที่ 1 เครื่องไลโอฟิไลซ์



ภาพผนวกที่ 2 การถ่ายเชื้อ

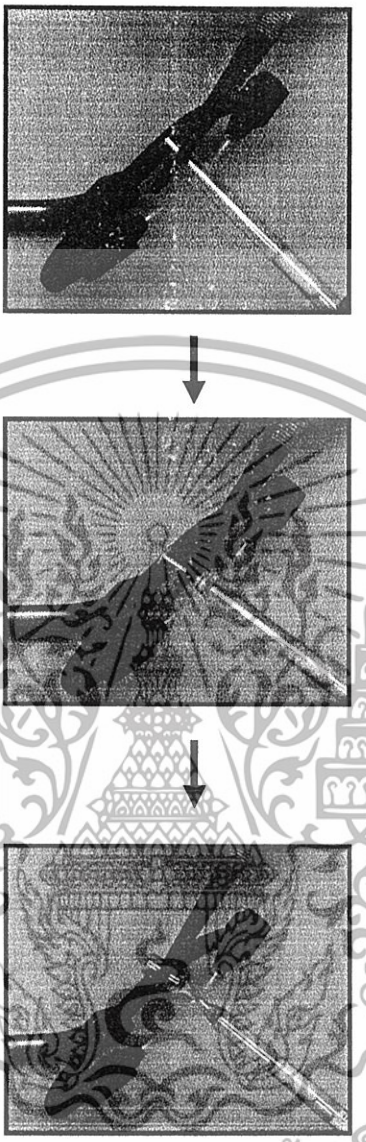
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 3 การแช่เย็นเชื้อโดยใช้แอกอฮอล์

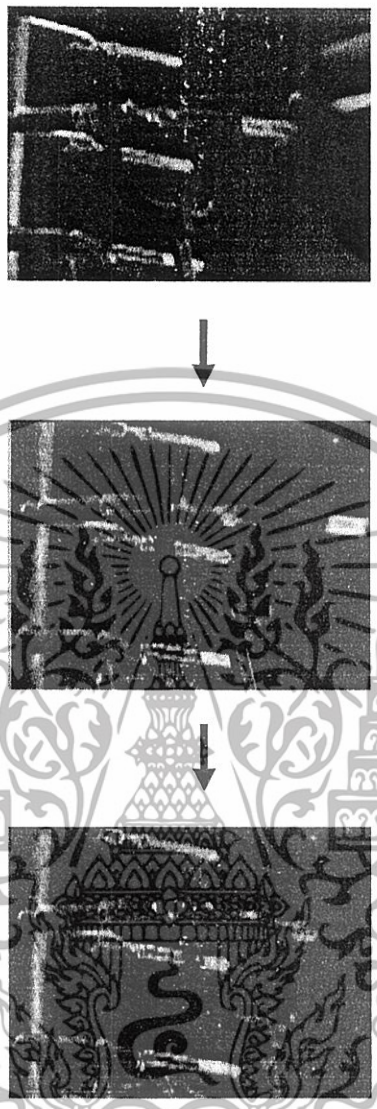
ภาพผนวกที่ 4 การเลียบหลอดแอมพูลกับเครื่องไลโอฟิไลซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



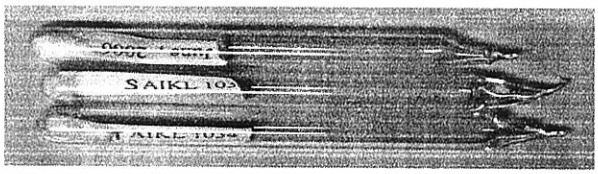
ภาพผนวกที่ 5 การกอดหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 6 การเชื่อมปิดหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 7 หลอดแอมพูลที่ทำการปิดปลายหลอดแล้ว

ภาพผนวกที่ 8 การตัดหลอดแอมพูล

ภาพผนวกที่ 9 หลอดแอมพูลที่ถูกตัดแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวลลิตา อุปสัน เกิดวันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2528 จังหวัดอุทัยธานี สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนหนองฉางวิทยา จังหวัดอุทัยธานี พ.ศ. 2546 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก)

นางสาวเลอสิริ ก้องเกียรติวงศ์ เกิดวันที่ 6 ธันวาคม พ.ศ. 2527 สุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2546 ปัจจุบันศึกษาอยู่ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก)

นางสาววาสนา หมื่นอักษร เกิดวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2527 จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนรัษฎานุประดิษฐ์อนุสรณ์ จังหวัดตรัง พ.ศ. 2546 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้