

การพัฒนากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งแบบคทีรีโอฟาจ C22 โดยการใช้
สารคงประสิทธิภาพสำหรับการเก็บรักษาในระยะยาว

IMPROVEMENT OF C22 PHAGE LYOPHILIZATION BY USING
EXCIPIENTS FOR LONG-TERM STORAGE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2566

KMITL-2023-EN-M-220-051

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IMPROVEMENT OF C22 PHAGE LYOPHILIZATION BY USING
EXCIPIENTS FOR LONG-TERM STORAGE



NATHIDA MANBUA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING IN CHEMICAL ENGINEERING
SCHOOL OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2023

KMITL-2023-EN-M-220-051

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2023

SCHOOL OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งแบบที่รีโอฟาจ C22 โดยการใช้สารคงประสิทธิภาพสำหรับการเก็บรักษาในระยะยาว
นักศึกษา	นางสาวณัฐธิดา มั่นบัว
รหัสประจำตัว	63601050
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
พ.ศ.	2566
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ธีรพร สุธีวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.อุดม แซ่เอ็ง

บทคัดย่อ

โรคเหี่ยวเกิดจากการติดเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัมของพืช โรคเหี่ยวสร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจมูลค่าประมาณหนึ่งพันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ทำให้โรคเหี่ยวเป็นโรคที่มีความสำคัญและเร่งด่วนในการศึกษา โดยแบคทีเรียโอฟาจหรือฟาจคือไวรัสของแบคทีเรีย มีความสามารถฆ่าแบคทีเรียผ่านการเพิ่มจำนวนฟาจภายในแบคทีเรีย วิทยานิพนธ์เล่มนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีสำหรับการยืดอายุการจัดเก็บรักษาฟาจ C22 เพื่อประยุกต์ใช้ฟาจ C22 เข้ามารักษาโรคเหี่ยวที่เกิดจากการติดเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม สายพันธุ์ RS3/1-1 ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เพื่อยืดอายุการจัดเก็บรักษาฟาจ C22 และเนื่องจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งก่อให้เกิดความเครียด นำไปสู่การเสื่อมสภาพของตัวอย่างระหว่างกระบวนการ จึงมีความจำเป็นในการศึกษาการนำสารคงประสิทธิภาพเข้ามาประยุกต์ใช้ในการรักษาสภาพธรรมชาติของฟาจจากความเครียดระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง สารคงประสิทธิภาพที่ศึกษา ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอล ภายในการทดลองจะมีการทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพทั้งก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งผ่านวิธีการทดสอบด้วยพลาค เพื่อค้นหาน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการรักษาการรอดชีวิตของฟาจร่วมกับการศึกษาการรวมกลุ่มและโครงสร้างของฟาจผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม สุดท้ายจะมีการนำวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเข้ามาค้นหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาคาดหวังว่าจะมีประโยชน์สำหรับการพัฒนาสูตรในการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 และส่งเสริมการนำฟาจเข้ามาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพอย่างเหมาะสม มีประสิทธิภาพ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Improvement of C22 Phage Lyophilization by Using Excipients for Long-term Storage
Student	Miss Nathida Manbua
Student ID	63601050
Degree	Master of Engineering
Program	Chemical Engineering
Year	2023
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Teeraporn Suteewong
Co-Thesis Advisor	Dr. Udom Sae-Ueng

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is a pathogenic bacterium that causes bacterial wilt disease, leading to an annual economic loss of around one billion dollars. As a consequence, eliminating bacterial wilt disease is urgent and critical. Bacteriophages, or phages, are viruses that kill bacteria by replicating themselves in bacteria. This study aims to find a practical approach for extending C22 phage shelf life for treating bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* strain RS3/1-1 via lyophilization. Lyophilization creates sample stresses leading to C22 phage degradation and requires excipients to assist the C22 phage in overcoming these problems. The excipients used in this study were glucose, galactose, sucrose, trehalose, lactose, and mannitol. Plaque assay was used to measure the remaining phage titer from pre- and post-lyophilization, showing the efficacy of excipients in preserving phage viability. Atomic force microscopy (AFM) imaging was used to investigate the aggregation and morphology of the C22 phage. Finally, the Box-Behnken design (BBD) was applied to achieve the optimal C22 phage formulation. The findings expect to improve phage formulation for C22 phage lyophilization and encourage phage use as a biocontrol agent to control the disease appropriately, effectively, and safely for the environment.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีด้วยคำแนะนำของอาจารย์ที่ปรึกษาทั้ง 2 ท่าน รศ.ดร.ธีรพร สุธีวงศ์ และดร.อุตม แซ่อึ้งที่ช่วยเหลือ แก้ไขความบกพร่องในวารสารที่ตีพิมพ์รวมถึง วิทยานิพนธ์ ความรู้ทางด้านวิชาการ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง

ผู้รับทุนได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติตาม สัญญารับทุนสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย เลขที่ SCA-CO-2563-12201-TH

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับความรู้ทางด้านวิชาการ รวมทั้ง คำปรึกษาในการจัดการกับปัญหา

ขอขอบคุณสถานที่ในการทำวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และคำแนะนำสำหรับการทำ วิจัยจากบุคคลในทีมวิจัยของห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์และประยุกต์ใช้สารชีวโมเลกุล (Biomolecular Analysis and Application Research Team)

ขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัวสำหรับการสนับสนุน และกำลังใจตลอดการศึกษาใน ระดับบัณฑิตศึกษา

ณัฐธิดา มั่นบัว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
ABSTRACT	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 โรคเหี่ยวเฉาหรือโรคเหี่ยว (Bacterial wilt disease)	6
2.1.1 การควบคุมโรคด้วยวิธีการเขตกรรม (Cultural method)	7
2.1.2 การควบคุมโรคด้วยวิธีการประยุกต์ใช้สารเคมี	8
2.1.3 การควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Biological control)	9
2.2 แบคทีริโอฟาจหรือฟาจ (Bacteriophage)	9
2.3 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Lyophilization)	13
2.3.1 กระบวนการแช่แข็งตัวอย่าง (Freezing)	13
2.3.2 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิ (Primary drying)	14
2.3.3 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นทุติยภูมิ (Secondary drying)	14
2.4 สารคงประสิทธิภาพ (Excipient)	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1	น้ำตาลโมลกุลเดี่ยว (Monosaccharides)	17
2.4.2	น้ำตาลโมลกุลคู่ (Disaccharides)	18
2.4.3	น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Sugar alcohols)	19
2.5	วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM)	24
2.5.1	วิธีการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design; CCD)	24
2.5.2	วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design; BBD)	25
บทที่ 3	ขั้นตอนการทดลอง	28
3.1	สารเคมี	28
3.2	อุปกรณ์และเครื่องมือ	29
3.3	การเตรียมสารเคมี	30
3.3.1	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	30
3.3.2	การเตรียมสารละลายความเข้มข้นสูง	30
3.3.3	การเตรียมบัฟเฟอร์ 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	31
3.4	การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture)	31
3.5	การเพิ่มจำนวนแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage propagation)	31
3.6	การทำแบคทีริโอฟาจให้บริสุทธิ์ (Bacteriophage purification)	32
3.7	การหาความเข้มข้นของแบคทีริโอฟาจผ่านวิธีการทดสอบด้วยพลาคว (Plaque assay)	33
3.8	การทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage lyophilization)	35
3.9	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีริโอฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope; AFM)	36
3.9.1	การเตรียมตัวอย่างฟาจก่อนการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)	36
3.9.2	การส่องภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM imaging)	36
3.9.3	การนับจำนวนอนุภาคฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)	37
3.10	การวิเคราะห์ข้อมูลตามหลักการทางสถิติด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ (Tukey-Kramer)	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การออกแบบการทดลองและหาสภาวะสำหรับการทำแห้งฟางแบบแช่แข็งที่เหมาะสม ด้วยวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	42
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพสำหรับการรักษาความชื้นฟาง C22 ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในรูปแบบสารละลาย	42
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพที่ถูกคัดเลือกสำหรับการรักษาความ ชื้นฟาง C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง	44
4.3 การวิเคราะห์อิทธิพลของสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลต่อระดับการรวมกลุ่มกันของ อนุภาคฟาง C22 โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM).....	48
4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีการทูคี-เครเมอร์	54
4.5 การวิเคราะห์หาสูตรที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาง C22 โดยวิธีการ ออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน	56
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	75
5.1 สรุปผลการทดลอง	75
5.2 ข้อเสนอแนะ	76
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก สารเคมี	93
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง.....	97
ภาคผนวก ค รูปภาพที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง	101
ประวัติผู้เขียน.....	105

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ปัจจัยและช่วงของปัจจัยที่กำหนดในการทดลอง.....	39
3.2 วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับปัจจัย 4 ปัจจัยและปัจจัยตอบสนอง 1 ปัจจัย.....	40
4.1 ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (Remaining phage titer) จากการทดลองผ่านวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับการศึกษา 4 ปัจจัยและ 1 ปัจจัยตอบสนอง	57
4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22	58
ก.1 ส่วนประกอบของอาหารเหลว CPG (CPG media).....	93
ก.2 ส่วนประกอบของอาหารอุ่นอ่อน CPG (CPG top agar).....	93
ก.3 ส่วนประกอบของอาหารอุ่นแข็ง CPG (CPG agar)	93
ก.4 ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความเข้มข้นไอออนเท่ากับ 0.04 M (IS=0.04)	94
ก.5 ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความเข้มข้นไอออนเท่ากับ 0.14 M (IS=0.14)	94
ก.6 ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความเข้มข้นไอออนเท่ากับ 0.24 M (IS=0.24)	94
ก.7 เกรดและบริษัทของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	95
ก.8 มวลโมเลกุล ความสามารถในการละลายน้ำ และอุณหภูมิสภาพแก้วของสารคงประสิทธิภาพ	96
ข.1 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์แต่ละสภาวะก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 15 วันเป็นระยะเวลา 45 วัน โดยจะมีการปรับวันที่ 0 ให้มีค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือเท่ากับ 100% สำหรับการเปรียบเทียบและแถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)	97
ข.2 การประยุกต์ใช้วิธีการทวี่-เครเมอร์สำหรับข้อมูลของแต่ละสภาวะสำหรับการจัดเก็บฟาจรูปแบบสารละลายระยะเวลา 45 วัน.....	97
ข.3 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์แต่ละสภาวะเทียบระหว่างก่อนและหลังการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 30 วันเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยจะมีการปรับวันที่ 0 ให้มีค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือเท่ากับ 100% สำหรับการเปรียบเทียบและแถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation).....	98

- ข.4 การประยุกต์ใช้วิธีการทูลี-เครเมอร์สำหรับข้อมูลของแต่ละสภาวะสำหรับการจัดเก็บฟาจรูป
แบบแห้งระยะเวลา 90 วัน..... 99
- ข.5 ร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 สำหรับการทดสอบ 4 สภาวะ
แถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) บ่งบอกถึงการเกิดความ
คลาดเคลื่อนจากการนับ (Counting error) ผ่านภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)..... 100
- ข.6 การประยุกต์ใช้วิธีการทูลี-เครเมอร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจาย
ตัวของอนุภาคฟาจ C22 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) สำหรับการทดสอบ 4 สภาวะ ... 100



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงร่างวิทยานิพนธ์ (Thesis outline).....	3
2.1 อาการความรุนแรงของโรคเหี่ยวในต้นมะเขือม่วงจากสเกล 0 – 5 (หมายเลข 0 คือ ไม่มีอาการ หมายเลข 1 คือ มะเขือม่วงแสดงอาการใบเหี่ยว 1 ใบ หมายเลข 2 คือ มะเขือม่วงแสดงอาการใบ เหี่ยว 2 - 3 ใบ หมายเลข 3 คือ ใบส่วนใหญ่ของต้นมะเขือม่วงเหี่ยว หมายเลข 4 คือ ใบทั้งหมดของ ต้นมะเขือม่วงเหี่ยว หมายเลข 5 ต้นมะเขือม่วงตายเนื่องจากโรคเหี่ยว)	7
2.2 ตัวอย่างโครงสร้างของฟาจมีหาง (Tailed phage) (a) ฟาจวงศ์ <i>Myoviridae</i> (b) ฟาจวงศ์ <i>Siphoviridae</i> (c) ฟาจวงศ์ <i>Podoviridae</i>	10
2.3 กระบวนการเพิ่มจำนวนของฟาจแบบ Lytic cycle.....	11
2.4 แผนผังวัฏภาคของน้ำ (Phase diagram) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง	13
2.5 ตัวอย่างโครงสร้างของกลูโคส	17
2.6 ตัวอย่างโครงสร้างของกาแลคโตส.....	17
2.7 ตัวอย่างโครงสร้างของซูโครส.....	18
2.8 ตัวอย่างโครงสร้างของทรีฮาโลส	18
2.9 ตัวอย่างโครงสร้างของแลคโตส.....	19
2.10 ตัวอย่างโครงสร้างของแมนนิทอล.....	20
2.11 ตัวอย่างโครงสร้างของวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางสำหรับ 3 ปัจจัย วงกลมสี่แดง คือจุดศูนย์กลาง (Center Point) วงกลมสีเขียว คือจุดมุม (Corner point) และวงกลมสีส้ม คือจุดแกน (Axial point).....	25
2.12 ตัวอย่างโครงสร้างของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับ 3 ปัจจัย วงกลมสีแดง คือจุด ศูนย์กลาง (Center Point) วงกลมน้ำเงิน คือจุดกึ่งกลาง (Middle point)	26
3.1 ลักษณะของพลาควาจากวิธีการทดสอบด้วยพลาควา (Plaque assay).....	34
3.2 ตัวอย่างผงฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง	35
4.1 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ แต่ละสภาวะก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 45 วัน แถบข้อผิดพลาด (Error bar) แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation).....	43

4.2 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์แต่ละสถานะเทียบระหว่างก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 30 วันเป็นระยะเวลา 90 วัน แถบข้อผิดพลาด (Error bar) แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation).....	44
4.3 ภาพอนุภาคฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (a) อนุภาคฟาจ C22 การกระจายตัวแบบเดี่ยว (ลูกศรสีขาว) และอนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกันประมาณ 2-3 อนุภาค (กล่องสี่เหลี่ยมเส้นประสีขาว) โดย Scale bar เท่ากับ 500 nm (b) รูปร่างของอนุภาคฟาจ C22 (เส้นประหกเหลี่ยมสีขาว) โดย Scale bar เท่ากับ 50 nm และ Color scale bar แสดงความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ (แถบด้านขวา).....	49
4.4 ภาพกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ทั้งการกระจายตัวแบบเดี่ยวและรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดยมี Color scale bar แสดงความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ (แถบด้านขวา) (a) อนุภาคฟาจ C22 กระจายตัวแบบเดี่ยวในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (b) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 2 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (c) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 4 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (d) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 15 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M (e) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 28 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M โดยรูป (a) (b) และ (c) มี Scale bar เท่ากับ 100 nm และรูป (d) และ (e) มี Scale bar เท่ากับ 200 nm.....	50
4.5 ร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ทั้งการกระจายตัวแบบเดี่ยวและรวมกลุ่มกันสำหรับการทดสอบ 4 สถานะภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ได้แก่ (a) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (b) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M (c) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M (d) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M แถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) บ่งบอกถึงการเกิดความคลาดเคลื่อนจากการนับ	52
4.6 กราฟ Residual plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22	60
4.7 กราฟ Half normal plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22	61
4.8 กราฟ Normal plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22	61
4.9 กราฟพาเรโต (Pareto chart) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22	62
4.10 กราฟ Main effects plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22	63
4.11 กราฟ Interaction plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และขอย้ำอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 กราฟ Contour plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	65
4.13 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) และความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	66
4.14 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) และความแข็งแรงไอออนของ บัฟเฟอร์ (C) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	66
4.15 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	67
4.16 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปริมาตรของฟาจ (D) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	67
4.17 กราฟ Surface plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	69
4.18 กราฟ Surface plot แสดงผลแบบ Wireframe สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22.....	69
4.19 เครื่องมือ Response optimizer สำหรับการสุตรที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบ แช่แข็งฟาจ C22.....	70
ค.1 เชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม สายพันธุ์ RS3/1-1 (Race 1 Biovar 4) (a) เชื้อถูกแยก (Isolation) บนอาหาร TZC (b) เชื้อถูก Subsequent บนอาหารวุ้นแข็ง CPG โดย Scale bar เท่ากับ 1 cm	101
ค.2 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	101
ค.3 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	102
ค.4 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	102
ค.5 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	103
ค.6 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	103
ค.7 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับ ซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M ในอาหารเหลว CPG จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ.....	104

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

โรคเหี่ยว หรือโรคเหี่ยวเขียว (Bacterial wilt disease) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) [1]–[6] เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ก่อโรคในพืชมากกว่า 200 สปีชีส์ [1], [6]–[8] สร้างความเสียหายต่อพืชทางเศรษฐกิจจำนวนมาก เช่น พริก มะเขือเทศ และมันฝรั่ง นับเป็นจำนวนความเสียหายทั่วโลกประมาณหนึ่งพันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี [5], [9] เชื้อแบคทีเรียราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัมเข้าทำลายพืชทางรากและตามรอยแผลของต้นพืชทั้งที่เกิดจากธรรมชาติ เช่น แมลง ไล่เดือน และความเสียหายที่เกิดจากเครื่องจักร อุปกรณ์ทางการเกษตร เช่น จอบ เสียม เป็นต้น ภายหลังจากเชื้อเข้าไปในลำต้นพืชแล้ว เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวน นำไปสู่การอุดตันบริเวณเนื้อเยื่อลำเลียงของต้นพืช ทำให้พืชไม่สามารถลำเลียงน้ำไปยังส่วนลำต้นและใบ เป็นสาเหตุให้ต้นพืชเหี่ยวเฉา [10] เนื่องจากโรคเหี่ยวเป็นเชื้อโรคที่อยู่ในดิน (Soil-borne pathogen) [6]–[7] และแพร่กระจายได้ง่ายผ่านช่องทางน้ำ ดิน สัตว์ และอุปกรณ์ทางการเกษตร ดังนั้นการใช้สารเคมี เช่น ยาฆ่าแมลง สารกำจัดศัตรูพืช จึงเป็นวิธีที่ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค [11]–[12] วิธีการกำจัดเชื้อโรคโดยใช้สารเคมียังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคเกษตรกรผู้ปลูก และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม ทำให้การควบคุมศัตรูพืชด้วยศัตรูตามธรรมชาติ เช่น แมลง เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส หรือที่เรียกว่าวิธีการควบคุมทางชีววิธี (Biological control หรือ Biocontrol) เป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากวิธีการควบคุมทางชีววิธี ช่วยลดปริมาณสารเคมีปนเปื้อนในธรรมชาติ และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การนำแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage) หรือฟาจ (Phage) ซึ่งก็คือแบคทีเรียไวรัสเข้ามาใช้ในการควบคุมโรคอันเกิดจากแบคทีเรีย เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษาและเริ่มใช้งานจริงในด้านเกษตรกรรม เนื่องจากฟาจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย สามารถเพิ่มจำนวนได้เองโดยอาศัยเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ [12]–[14] ทำให้วิธีการทางชีวภาพโดยการใช้ฟาจสำหรับควบคุมโรคเป็นหนึ่งในวิธีที่น่าสนใจสำหรับการนำเข้ามาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol agent)

ถึงแม้ว่าการเลือกใช้ฟาจจะเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการควบคุมโรคเหี่ยว แต่อุปสรรคทางด้านความคงความเสถียรของฟาจทำให้การจัดเก็บรักษาฟาจทำได้ยาก เนื่องจากฟาจสูญเสียความเสถียรได้ง่าย ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่รุนแรง เช่น การเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ [15]–[16] จึงจำเป็นต้องหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพเพื่อช่วยยืดระยะเวลาการจัดเก็บรักษาฟาจ โดยต้องคำนึงถึงการขนส่งฟาจตามพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งหลายแห่งอยู่ในพื้นที่ห่างไกล ไม่มีตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไฟฟ้าเข้าถึง ดังนั้นฟาจต้องสามารถเก็บรักษาได้โดยไม่สูญเสียความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย ทำให้การขนส่งฟาจในรูปแบบสารละลายจึงไม่เหมาะสม เนื่องจากฟาจในรูปแบบแห้งสามารถตอบสนองความต้องการได้มากกว่า เนื่องจากน้ำหนักเบา ง่ายต่อการขนส่ง และอายุการจัดเก็บรักษายาวนานมากกว่าฟาจในรูปแบบสารละลาย [17]-[18] อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนการทำฟาจในรูปแบบแห้งผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Lyophilization) ก่อให้เกิดความเครียดในระหว่างกระบวนการ นำไปสู่การเกิดความเสียหายต่อโครงสร้างและการรอดชีวิตของฟาจ [18]-[20] เพื่อคงสภาพธรรมชาติของฟาจจึงมีการนำสารคงประสิทธิภาพ (Excipient) เข้ามาใช้เป็นไครโอโพรเทกแทนต์ (Cryoprotectant) เพื่อช่วยรักษาโครงสร้างตามธรรมชาติ คงความเสถียรและเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตของฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง หลายงานวิจัย พบว่าสารคงประสิทธิภาพทางชีววิทยาที่ดีที่สุดส่วนใหญ่คือน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ [16]-[17], [21]-[22] นิยมนำมาศึกษา เนื่องจากน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์สามารถหาได้ง่ายและราคาถูก ดังนั้นการนำน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์เข้ามาประยุกต์ใช้สำหรับการคงสภาพฟาจจึงมีความน่าสนใจและเป็นหนึ่งในทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการนำมาใช้เป็นสารคงประสิทธิภาพ

งานวิจัยในวิทยานิพนธ์มุ่งศึกษาเกี่ยวกับการรักษาโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราลสโตเนียโซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) โดยการนำฟาจ C22 เข้ามาประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวด้วยวิธีการทางชีวภาพ ผ่านกลไกความสามารถของฟาจที่สามารถทำลายเซลล์เจ้าบ้านได้ดี ทั้งนี้หนึ่งในอุปสรรคที่ขัดขวางการนำฟาจมาประยุกต์ใช้ คือความอ่อนไหวต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงของฟาจ จึงมีการแก้ปัญหาโดยการนำกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อยืดระยะเวลาในการจัดเก็บรักษาฟาจร่วมกับการใช้สารคงประสิทธิภาพเพื่อช่วยคงสภาพฟาจ C22 เมื่อต้องเผชิญกับความเครียดระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยสามารถวัดประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพในการรักษาการรอดชีวิตของฟาจผ่านวิธีการทดสอบด้วยพลาคเพื่อหาความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (Remaining phage titer) ทั้งก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งร่วมกับการศึกษาอิทธิพลของการรวมกลุ่มและโครงสร้างของฟาจผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscopy; AFM) ภายหลังการศึกษาการใช้สารคงประสิทธิภาพเพียงอย่างเดียวสำหรับการจัดเก็บรักษาฟาจ C22 จึงได้มีการศึกษาปัจจัยที่น่าจะมีนัยสำคัญเพิ่มเติมผ่านวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design; BBD) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22



รูปที่ 1.1 โครงร่างวิทยานิพนธ์ (Thesis outline)

1.2 วัตถุประสงค์

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาวิธีการยืดอายุการจัดเก็บฟาจ C22 ที่สามารถรักษาการรอดชีวิตของฟาจ C22 ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งรวมกับการใช้สารคงประสิทธิภาพ สามารถแยก วัตถุประสงค์ได้ ดังนี้

1. เพื่อศึกษาสารคงประสิทธิภาพในกลุ่มน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีความสามารถในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของแบคทีรีโอฟาจ C22 รูปแบบแห้งด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบแช่แข็งในระยะยาว
2. เพื่อสร้างองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของแบคทีรีโอฟาจ C22 รูปแบบแห้งและความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีรีโอฟาจ C22 และสารคงประสิทธิภาพ (Phage-exciptient interaction) จากข้อมูลภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)
3. เพื่อออกแบบการทดลองด้านการทำให้แห้งแบบแช่แข็งของแบคทีรีโอฟาจ C22 โดยใช้วิธีการออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน
4. เพื่อพัฒนา ค้นหา และปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีรีโอฟาจ C22 ผ่านวิธีการออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคนเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการรักษาความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีรีโอฟาจ C22

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ เชื้อราลสโตเนีย โคลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สายพันธุ์ RS3/1-1 (Race 1 Biovar 4) เติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน (Aerobic bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้ก่อโรคเหี่ยวในพริกไทยและมะเขือเทศที่พบได้บ่อยในประเทศไทย

2. แบคทีเรียโอฟาจที่ใช้ในการศึกษา คือ แบคทีเรียโอฟาจ C22 อยู่ในวงศ์ *Podoviridae* กลไกในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟาจแบบไลติก (Lytic cycle) แบคทีเรียโอฟาจ C22 มีความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม สายพันธุ์ RS3/1-1 โดยแบคทีเรียโอฟาจ C22 ถูกแยกออกมาจากตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย [23]-[24]
3. การวิเคราะห์การรอดชีวิตของแบคทีเรียโอฟาจ C22
 - 3.1. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ C22 หน่วย PFU/ml ด้วยวิธีการทดสอบด้วยพลาคา
 - 3.2. การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ C22 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)
4. ตัวแปรที่ศึกษา
 - 4.1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่
 - 4.1.1. สารคงประสิทธิภาพ ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอล
 - 4.1.2. ความเข้มข้นของสารคงประสิทธิภาพ (0 ถึง 0.5 M)
 - 4.1.3. ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (0 ถึง 0.24 M)
 - 4.1.4. ปริมาตรของแบคทีเรียโอฟาจ (100 ถึง 300 μ l)
 - 4.2. ตัวแปรตาม คือ ความเข้มข้นแบคทีเรียโอฟาจคงเหลือ
 - 4.3. ตัวแปรควบคุม ได้แก่
 - 4.3.1. เชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม สายพันธุ์ RS3/1-1
 - 4.3.2. แบคทีเรียโอฟาจ C22 วงศ์โไฟโดไวรัส
 - 4.3.3. เชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัมถูกเลี้ยงในอาหารเหลว CPG

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ค้นพบสารคงประสิทธิภาพที่มีความสามารถสำหรับการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของแบคทีเรียโอฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งและมีประสิทธิภาพในการยืดอายุการจัดเก็บรักษาแบคทีเรียโอฟาจ C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไก ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีรีโอฟาจ C22 และสารคงประสิทธิภาพในการคงสภาพแบคทีรีโอฟาจ C22 มากขึ้นผ่านการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)
3. ปรับปรุงและพัฒนากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีรีโอฟาจ C22 ทำให้แบคทีรีโอฟาจ C22 สามารถคงสภาพได้ดี ส่งผลให้ง่ายต่อการขนส่งทางไกลและการจัดเก็บในอุณหภูมิห้อง
4. ค้นพบปัจจัยที่มีนัยสำคัญ และสภาวะที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาสภาวะการทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีรีโอฟาจ C22 ผ่านวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับการจัดเก็บรักษาแบคทีรีโอฟาจ C22 ในระยะยาว
5. ค้นพบวิธีการและความรู้ที่สามารถลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่อาจเกิดการปนเปื้อนและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยการใช้แบคทีรีโอฟาจ C22 เป็นสารควบคุมทางชีวภาพเพื่อนำมาปรับใช้ในการปรับปรุงกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีรีโอฟาจ C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หัวข้อนี้จะกล่าวถึงทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย เพื่อสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับความสำคัญของโรคเหี่ยวที่ก่อโรคในพืชทางเศรษฐกิจที่ทำให้เกิดความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการหาวิธีการในการรักษาโรคเหี่ยวผ่านทางการนำศาสตร์ด้านต่างๆ เข้ามาประยุกต์ใช้ บทที่ 2 นี้ประกอบด้วยหัวข้อย่อย ได้แก่ โรคเหี่ยว แบคทีเรียโอฟาจ กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง สารคงประสิทธิภาพ และวิธีการฟื้นผิวดอกสนอง

2.1 โรคเหี่ยวเหี่ยวหรือโรคเหี่ยว (Bacterial wilt disease)

โรคเหี่ยวเหี่ยว หรือโรคเหี่ยวเกิดจากการที่ต้นพืชติดเชื้อแบคทีเรียราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ซึ่งเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน [4], [6] โดยเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) เติบโตภายใต้สภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน (Aerobic bacteria) นอกจากนี้เชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัมเป็นเชื้อแบบ Species complex มี Host range ที่กว้างและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ไฟโลไทป์ (Phylotypes I-IV) 5 เรซ (Races 1-5) 5 ไบโอฟาร์ (Biovars 1-5) โดยขึ้นอยู่กับพื้นที่การแพร่กระจายของเชื้อ Host range และสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา (Biochemical and physiological characteristics) เชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัมสามารถติดเชื้อในพืชได้มากกว่า 200 สปีชีส์ พบการแพร่กระจายมากในเขตร้อน (Tropics) และกึ่งเขตร้อน (Subtropics) โรคเหี่ยวแพร่กระจายได้ง่ายในอากาศอบอุ่นและชื้น [6] ตัวอย่างพืชที่ได้รับผลกระทบจากโรคเหี่ยว ได้แก่ มันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกขิง เป็นต้น [1], [5]-[6], [25] โดยโรคเหี่ยวเป็นหนึ่งในโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การระบาดของโรคสร้างความเสียหายต่อมูลค่าทางเศรษฐกิจราว 1 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐต่อปี [1], [5]

กลไกการเข้าติดเชื้อของต้นพืชเริ่มจากเชื้อเข้าสู่ต้นพืชบริเวณรอยแผลทางราก ซึ่งอาจเป็นรอยแผลที่เกิดตามธรรมชาติ เช่น แมลง ไล่เดือน การเจริญเติบโตของต้นพืช หรือเกิดจากอุปกรณ์ทางการเกษตร เช่น จอบ และ เสียม เมื่อเชื้อเข้าสู่ต้นพืชจะมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อลำเลียงน้ำ (Xylem) และกระจายไปตามส่วนต่างๆ ของต้นพืช ปิดกั้นทางเดินของน้ำ จนในที่สุดพืชจะเกิดอาการเหี่ยวและตาย โดยเมื่อเชื้อสิ้นสุดวงจรชีวิตภายในต้นพืช เชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัมจะไหลออกมาจากบริเวณไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) และแพร่กระจายไปยังต้นพืชต้นอื่น โดยอาการของพืชที่ติดเชื้อมักแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 อาการความรุนแรงของโรคเหี่ยวในต้นมะเขือม่วงจากสเกล 0 – 5

(หมายเลข 0 คือ ไม่มีอาการ หมายเลข 1 คือ มะเขือม่วงแสดงอาการใบเหี่ยว 1 ใบ หมายเลข 2 คือ มะเขือม่วงแสดงอาการใบเหี่ยว 2 - 3 ใบ หมายเลข 3 คือ ใบส่วนใหญ่ของต้นมะเขือม่วงเหี่ยว หมายเลข 4 คือ ใบทั้งหมดของต้นมะเขือม่วงเหี่ยว หมายเลข 5 ต้นมะเขือม่วงตายเนื่องจากโรคเหี่ยว) [26]

วิธีการกำจัดโรคเหี่ยวทำได้ยาก เนื่องจากโรคเหี่ยวเป็นโรคในดิน (Soil-borne pathogen) มี Host range ที่กว้างและสามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน ตั้งแต่หลายสัปดาห์จนถึงหลายปี โดยพบว่าเชื้อสามารถอาศัยอยู่ในน้ำได้มากกว่า 40 ปีที่อุณหภูมิ 20-25 °C แต่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ภายใต้สภาวะที่รุนแรง [1], [4], [6] นอกจากนี้เชื้อยังสามารถแพร่กระจายได้ง่ายผ่านหลายช่องทาง เช่น การไหลของน้ำ การใช้อุปกรณ์ทางการเกษตรร่วมกัน รวมไปถึงการแพร่กระจายผ่านสัตว์และแมลงในพื้นที่เกษตรกรรม

ในปัจจุบัน วิธีการกำจัดและควบคุมโรคเหี่ยว สามารถแบ่งได้เป็นหลายวิธี ยกตัวอย่างได้ดังนี้

2.1.1 การควบคุมโรคด้วยวิธีการเกษตรกรรม (Cultural method)

วิธีการเกษตรกรรมเป็นวิธีการที่ทำให้สภาพดินไม่เหมาะสมสำหรับการเกิดโรคเหี่ยว เช่น

2.1.1.1 การปลูกพืชหมุนเวียน (Crop rotation)

การปลูกพืชหมุนเวียน นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่แพร่กระจายผ่านดิน มีประโยชน์ในการช่วยลดผลกระทบที่เกิดจากโรคพืช เนื่องจากการปลูกพืชชนิดเดิมสามารถนำไปสู่การระบาดของโรคพืชที่มีความรุนแรงมากขึ้น [4]-[5] โดยการศึกษาของ Adhikari และ Basnyat มีการศึกษาผลจากการปลูกพืชหมุนเวียนในมะเขือเทศกับพืชชนิดอื่น พบว่าความรุนแรงของโรคเหี่ยวที่เกิดขึ้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 20-26% [27] และการศึกษาของ Ayana และ Fininsa พบว่าการปลูกพืชหมุนเวียนสามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้ถึง 29% [28] แต่การปลูกพืชหมุนเวียนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่ำ ควรมีการนำวิธีการอื่นเข้ามาประยุกต์ใช้ร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.2 การพัฒนาพันธุ์พืชให้ทนทานต่อเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอร์รัม (Cultivar resistance)

การพัฒนาพันธุ์พืชถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ยั่งยืน และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมวิธีหนึ่ง แต่มีความท้าทายในด้านของการดัดแปลงพันธุกรรมของพืช (Breeding) เพื่อให้ได้พันธุ์พืชที่มีความทนทานต่อเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอร์รัม นอกจากนี้ยังต้องเจอกับอุปสรรคเนื่องมาจากเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอร์รัมมี Host range ที่กว้าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้ยากและท้าทาย [4]-[5] ตัวอย่างการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์พืชโดย Lin และคณะ พบว่าการเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถช่วยให้มะเขือเทศมีความทนทานต่อโรคเหี่ยวได้ดีมาก [29]

2.1.1.3 การใช้สารปรับปรุงดิน (Soil amendment)

การใช้สารปรับปรุงดินเป็นหนึ่งในวิธีที่ถูกรับรองเพื่อยับยั้งความรุนแรงของโรคเหี่ยว [4], [6] เช่น การใช้แคลเซียม (Calcium) ในการยับยั้งความรุนแรงของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ มีความนิยมนำมาใช้เป็นสารปรับปรุงดินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอร์รัม [5] การศึกษาของ Yamazaki และคณะ เกี่ยวกับการใช้สารปรับปรุงดินยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ พบว่าการใช้แคลเซียมสามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้ [30]

2.1.2 การควบคุมโรคด้วยวิธีการประยุกต์ใช้สารเคมี

วิธีการใช้สารเคมีจำพวกยาฆ่าแมลง ยาจำกัดวัชพืช เช่น การใช้สารเคมี Bismethiazol (หรือ 5-[[[(2-sulfanylidene-3H-1,3,4-thiadiazol-5-yl)amino]methylamino]-3H-1,3,4-thiadiazole-2-thione) และสารเคมี Saisentong (หรือ copper;5-[[[(5-sulfido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino]methylamino]-1,3,4-thiadiazole-2-thiolate) ในการควบคุมโรคเหี่ยว [4] รวมถึงการพ่นควันรมยา (Fumigation) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ ราคาแพง ส่งผลเสียต่อสัตว์และมนุษย์ การใช้สารเคมีเป็นประจำอย่างต่อเนื่องในปริมาณมากอาจส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมได้ในระยะยาว [4]-[6]

ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งโรคโดยใช้สารเคมี เช่น การศึกษาของ Santos และคณะ มีการศึกษาการใช้สารเคมีเมทิลโบรไมด์ (Methyl bromide) ร่วมกับสารกำจัดวัชพืชและฟิล์ม (Virtually impermeable film) ในการควบคุมโรคในมะเขือเทศทั้ง 3 ฤดู ผลการศึกษา พบว่าการใช้เมทิลโบรไมด์ร่วมกับ 1,3-ไดคลอโรโพรเพน (1,3-dichloropropene) ช่วยลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้ดีตลอดการศึกษาทั้ง 3 ฤดู [31] และการศึกษาของ Sigh และคณะ พบว่าความรุนแรงของโรคเหี่ยวลดลงประมาณ 50-52% เมื่อใช้สารเคมีแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ร่วมกับสารฟอกขาว (Bleaching powder) [32]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Biological control)

วิธีการทางชีวภาพใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวผ่านการนำสารควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol agent) เช่น แบคทีเรีย หรือไวรัส ตัวอย่างการนำวิธีการทางชีวภาพเข้ามาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยว เช่น การศึกษาของ Álvarez และคณะ พบว่าการนำฟาจเข้ามาใช้ควบคุมโรคเหี่ยว สามารถลดจำนวนประชากรของเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม Phylotype II [33] การศึกษาของ Yamada และคณะ ทดสอบความสามารถในการเข้าติดเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม สายพันธุ์ C319 ของฟาจ ϕ RSS1 พบว่าการใช้ฟาจ ϕ RSS1 ทำให้พฤติกรรมของเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัมเปลี่ยนไปหลายอย่าง เช่น Culture ของเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัมขุนน้อยลง และการเจริญเติบโตของเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัมลดลงประมาณ 60% [34]

นอกจากนี้วิธีการทางชีวภาพยังถูกนำไปประยุกต์ในการศึกษาการควบคุมโรคอื่น เช่น การศึกษาโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight) ในต้นข้าวของการศึกษาของ Dong และคณะ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo) มีการใช้ฟาจ Xoo-sp2 สำหรับควบคุมเชื้อก่อโรค ผลการศึกษาต้นข้าวในกระถางเป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าฟาจ Xoo-sp2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Xoo ได้ดี โดยเฉพาะเมื่อระยะเวลาผ่านไป 9 วัน พบความเข้มข้นของเชื้อก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [35] เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Gasic และคณะ ศึกษาการใช้ฟาจ KΦ1 ในการควบคุมโรคใบจุด (Bacterial spot) บนพริกที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas euvesicatoria* พบว่าฟาจ KΦ1 สามารถรอดชีวิตได้อย่างน้อย 7 วันโดยไม่พบเซลล์เจ้าบ้าน และการใช้ฟาจ KΦ1 ร่วมกับสารเคมีคอปเปอร์ ไฮดรอกไซด์ (Copper hydroxide) ในการควบคุมโรคใบจุดมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมีคอปเปอร์ ไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว [36]

ข้อดีของวิธีการทางชีวภาพ ได้แก่ ปลอดภัย ยั่งยืน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการนำไวรัสเข้ามาใช้ ซึ่งถือเป็นศัตรูตามธรรมชาติของเชื้อราสโตเนีย โซลานาซีเอรัม โดยในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ มีการศึกษาการนำแบคทีรีโอฟาจ หรือฟาจเข้ามาใช้สำหรับเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เนื่องจากฟาจเป็นศัตรูตามธรรมชาติของแบคทีเรีย มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเองได้ตามธรรมชาติ แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้ภายหลังเซลล์เจ้าบ้านหมดไป ทำให้การใช้ฟาจเป็นวิธีการควบคุมโรคเหี่ยวที่น่าสนใจ [5]

2.2 แบคทีรีโอฟาจหรือฟาจ (Bacteriophage)

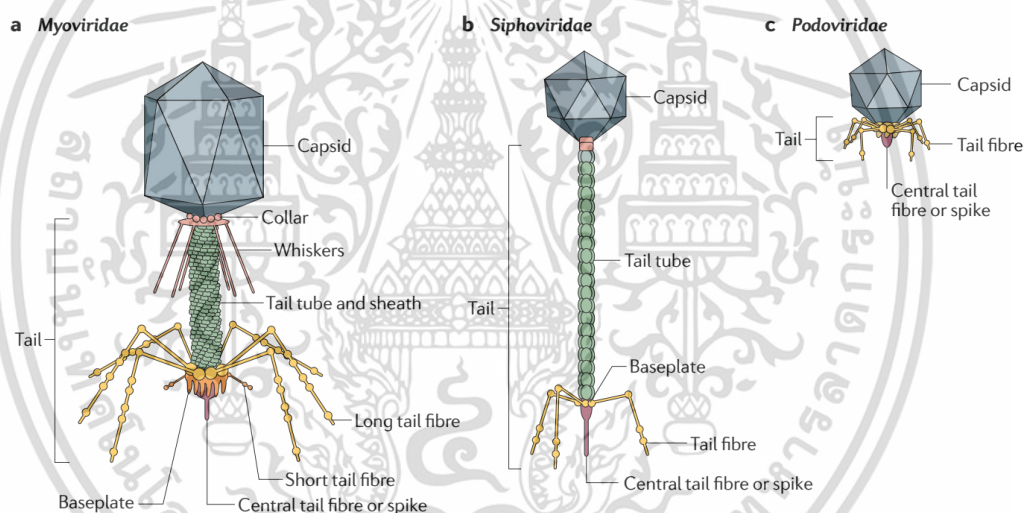
แบคทีรีโอฟาจ หรือฟาจ คือไวรัสที่มีความสามารถในการฆ่าเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) [37]–[39] โดยฟาจมีอยู่จำนวนมากในธรรมชาติประมาณ 10^{31} ตัว สามารถพบได้ในทุกสภาพแวดล้อมที่มีแบคทีเรียเติบโต ทั้งในดิน ทะเล บ่อน้ำพุร้อน [15] มีขนาดโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 20-200 nm [40] ฟาจส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติเป็นประเภทฟาจมีหาง (Tailed phage) พบมากกว่า 96% ของฟาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดและอีก 4% ประกอบด้วยฟาจมีหัวรูปร่างหลายเหลี่ยม (Polyhedral) ฟาจมีรูปร่างคล้ายเส้นใย (Filamentous) และฟาจมีรูปร่างไม่แน่นอน (Pleomorphic) [41] โดยฟาจมีหางถูกจัดอยู่ในอันดับ (Order) *Caudovirales*

ฟาจสามารถจำแนกได้ตามคณะกรรมการระหว่างประเทศว่าด้วยอนุกรมวิธานวิทยาของไวรัส (International Committee on Taxonomy of Viruses) ได้เป็น 3 วงศ์ (Family) ตามขนาดและลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของไวรัส [15], [41]-[42] ได้แก่

1. *Myoviridae* เป็นฟาจหางยาวและสามารถยืดหดได้ (Contractile tail) [41]-[42]
 2. *Siphoviridae* เป็นฟาจหางยาว หางไม่สามารถยืดหดได้ (Noncontractile tail) [41]-[42]
 3. *Podoviridae* เป็นฟาจหางสั้น หางไม่สามารถยืดหดได้ (Noncontractile tail) [41]-[42]
- ตัวอย่างโครงสร้างของฟาจแสดงในภาพที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้างของฟาจมีหาง (Tailed phage)

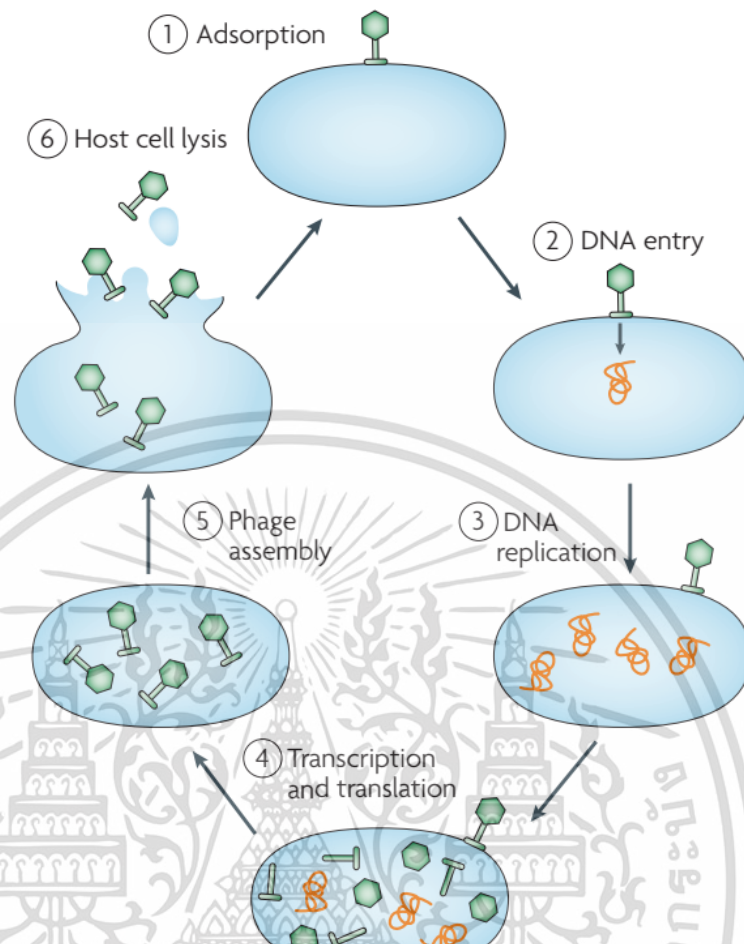
(a) ฟาจวงศ์ *Myoviridae* (b) ฟาจวงศ์ *Siphoviridae* (c) ฟาจวงศ์ *Podoviridae* [43]

โครงสร้างหลักของฟาจ ประกอบด้วย

1. ส่วนหัว บรรจุกรดนิวคลีอิก (Nucleic acids) ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม สามารถเป็นได้ทั้งดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ถูกหุ้มด้วยโปรตีนที่เรียกว่าแคปซิด [37]
2. ส่วนหาง ทำหน้าที่ในการลำเลียงสารพันธุกรรมเข้าสู่แบคทีเรีย [37]

โดยฟาจจัดเป็น Intracellular parasites ต้องการเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโต [37], [40]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 กระบวนการเพิ่มจำนวนของฟาจแบบ Lytic cycle [44]

กลไกในการเพิ่มจำนวนของฟาจ แบ่งได้เป็นไลติก (Lytic cycle) และไลโซจีนิก (Lysogenic cycle) โดยฟาจ C22 มีกลไกในการเพิ่มจำนวนของฟาจแบบไลติก สามารถอธิบายขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของฟาจแบบไลติก [37]–[40] ดังรูปที่ 2.3 เริ่มจาก

1. กระบวนการยึดเกาะของฟาจกับโปรตีนตัวรับบนเยื่อหุ้ม (Receptor site) ของแบคทีเรีย
2. กระบวนการส่งสารพันธุกรรมสู่ไซโทพลาซึม (Cytoplasm) ของแบคทีเรีย
3. กระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของฟาจ
4. กระบวนการถอดรหัส (Transcription) และการแปลรหัส (Translation) ของสารพันธุกรรมและใช้กลไกของแบคทีเรียในการสังเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ของฟาจ
5. กระบวนการรวมตัวของส่วนประกอบต่างๆ ของฟาจ จนกลายเป็นฟาจตัวใหม่แบบสมบูรณ์ ซึ่งเราสามารถเรียกว่า ฟาจลูกหลาน หรือฟาจรุ่นต่อไป (Progeny phage)
6. กระบวนการหลั่งเอนไซม์ของฟาจเพื่อส่งการให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกและปลดปล่อย

ฟาจจำนวนมากออกมาภายนอกแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกในการเพิ่มจำนวนและคุณสมบัติทั่วไปของฟาจ ทำให้การประยุกต์ใช้ฟาจเป็นสารควบคุมทางชีวภาพเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ดังนี้

1. ฟาจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย [37]
2. ฟาจเพิ่มจำนวนตัวเองโดยอาศัยเซลล์เจ้าบ้าน [37]
3. การใช้ฟาจไม่ทิ้งสารตกค้าง เนื่องจากฟาจสามารถหยุดการเพิ่มจำนวนได้เอง ภายหลังจากเซลล์เจ้าบ้านหมดไป [37], [40]
4. ฟาจสามารถปรับตัว เมื่อเกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย [39]
5. ฟาจปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากความจำเพาะของฟาจต่อแบคทีเรีย [37]

จากคุณสมบัติและความสามารถของฟาจ ทำให้ฟาจถูกนำไปประยุกต์ใช้หลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ พันธุวิศวกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และเกษตรกรรม [14]-[15], [45] โดยเฉพาะทางด้านเกษตรกรรม มีความสนใจในการประยุกต์ใช้ฟาจสำหรับการควบคุมโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การศึกษาการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas syringae* และเชื้อในสกุล (Genus) *Xanthomonas* [14]

อุปสรรคของการประยุกต์ใช้ฟาจสำหรับการควบคุมเชื้อก่อโรค ได้แก่ ฟาจมีความอ่อนไหวและง่ายต่อการสูญเสียการรอดชีวิตอันเนื่องมาจากปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของเกลือ และไอออน [16] ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างและสภาพตามธรรมชาติของฟาจ ทำให้ฟาจไม่สามารถรักษาความสามารถในการทำลายเชื้อได้ตามปกติ

ตัวอย่างการศึกษาปัจจัยภายนอกที่ส่งผลกระทบต่อความเสถียรของฟาจ เช่น การศึกษาของ Jepson และ March มีการทดสอบระยะเวลาการจัดเก็บฟาจ λ ในสภาวะต่างกันที่อุณหภูมิ 4 20 37 และ 42 °C ในบัฟเฟอร์ SM พบว่าฟาจ λ สามารถรักษาความเสถียรได้ดีที่อุณหภูมิ 4 และ 20 °C ตลอดระยะเวลาการจัดเก็บ เมื่อเทียบกับการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 37 และ 42 °C ที่พบว่าฟาจไม่เหลือความเข้มข้นภายหลังระยะเวลาการจัดเก็บ 84 และ 120 วันตามลำดับ สำหรับการทดสอบความเสถียรของฟาจในช่วงการปรับเปลี่ยนค่า pH ที่อุณหภูมิ 20 °C ในบัฟเฟอร์ SM พบว่าฟาจ λ รักษาความเสถียรได้ดีในช่วง pH เท่ากับ 3-11 โดยไม่พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจ λ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นฟาจในช่วง pH เท่ากับค่าอื่นที่พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจ λ [46] นอกจากนี้ Jepson และ March ยังมีการศึกษาความแตกต่างของการรักษาความเสถียรของฟาจ λ ระหว่างการเจือจางฟาจด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น พบว่าฟาจ λ สามารถคงความเสถียรในน้ำกลั่นได้ดีกว่าน้ำประปา

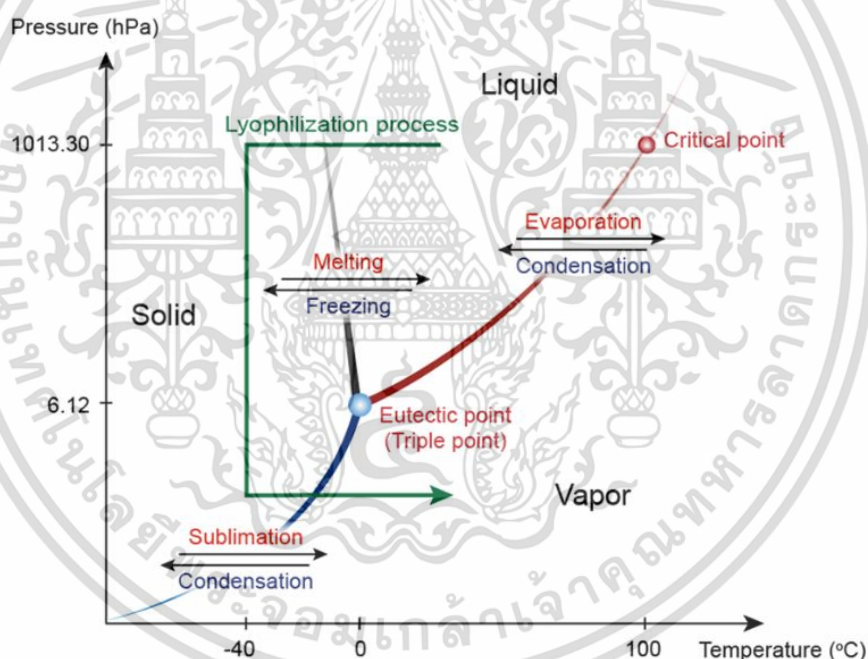
นอกจากนี้การศึกษาฟาจ MS2 ของ Govenal และ Gerba พบว่าความเสถียรของฟาจ MS2 ขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำและค่า pH โดยพบการลดลงของความเข้มข้นฟาจ MS2 ในน้ำ Ultrapure มากกว่าน้ำประปา [47]

จากการศึกษาข้างต้น สามารถกล่าวได้ว่าอิทธิพลของปัจจัยภายนอก ส่งผลต่อความเข้มข้นของฟาจ เพื่อลดผลกระทบจากปัจจัยภายนอกที่อาจจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างและความเสถียร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของฟาจ จึงมีการนำกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาสภาพธรรมชาติของสารชีวโมเลกุล เข้ามาใช้ในการยืดระยะเวลาการจัดเก็บ และคงความเสถียรของฟาจ

2.3 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Lyophilization)

กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเป็นกระบวนการดึงน้ำออกจากตัวอย่างหรือผลิตภัณฑ์ โดยเริ่มจากการแช่แข็งตัวอย่างที่ต้องการทำแห้งแบบแช่แข็ง หลังจากนั้นลดความดันให้ต่ำกว่าความดันบรรยากาศ และเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้โมเลกุลของน้ำในตัวอย่างเกิดการระเหิดกลายเป็นไอ โดยไม่ผ่านกระบวนการระเหย [48]–[51] กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ กระบวนการแช่แข็งตัวอย่าง (Freezing) กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิ (Primary drying) และกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นทุติยภูมิ (Secondary drying) โดยแต่ละขั้นตอนสามารถอธิบายการเกิดได้ด้วยแผนผังวัฏภาค (Phase diagram) ดังรูป 2.4 [49]–[50], [52]–[53]



รูปที่ 2.4 แผนผังวัฏภาคของน้ำ (Phase diagram) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง [54]

2.3.1 กระบวนการแช่แข็งตัวอย่าง (Freezing)

กระบวนการแช่แข็งตัวอย่างถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเตรียมตัวอย่างสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยการแช่แข็งตัวอย่างต้องใช้อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing point) หรืออุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของแข็ง [53], [55] ทั้งนี้การแช่แข็งจำเป็นต้องทำให้แน่ใจว่าตัวอย่างจะกลายเป็นของแข็งอย่างสมบูรณ์ เพื่อป้องกันการละลายของตัวอย่างก่อนการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหิดของโมเลกุลน้ำกลายเป็นไอออกจากตัวอย่างระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิ [50], [53] โดยการแช่แข็งสามารถทำได้หลากหลายรูปแบบตามความเหมาะสม เช่น การแช่แข็งตัวอย่างภายในตู้แช่แข็ง หรือการแช่แข็งตัวอย่างภายในชั้นวางของเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง [53] สำหรับวิธีการแช่แข็งสามารถทำได้ทั้งแบบช้าและเร็ว โดยวิธีการแช่แข็งแบบเร็วจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กเมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบช้าที่ให้ผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ [48], [53] การเลือกวิธีการแช่แข็งให้เลือกตามความเหมาะสมกับตัวอย่าง สำหรับสารชีวโมเลกุลนิยมวิธีการแช่แข็งแบบเร็วมากกว่าแบบช้า [50] เนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ส่งผลเสียต่อสารชีวโมเลกุล โดยการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่อาจนำไปสู่การทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย หรือโครงสร้างต่างๆ ของสารชีวโมเลกุลมากกว่าการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก [50] แต่ข้อดีของการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ คือ การระเหิดของโมเลกุลน้ำภายในตัวอย่างเกิดขึ้นง่ายและรวดเร็วกว่าการระเหิดของโมเลกุลน้ำภายในตัวอย่างของผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก เนื่องจากโมเลกุลของน้ำในผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้สะดวกกว่าโมเลกุลของน้ำในผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก [48], [53]

2.3.2 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิ (Primary drying)

กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิจะมีการนำตัวอย่างเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง ภายในระบบจะมีการลดความดันต่ำกว่าจุดร่วมสาม (Triple point) ซึ่งเป็นจุดที่ของแข็งของเหลว และก๊าซสามารถอยู่ร่วมกันได้ และให้ความร้อนเพื่อช่วยในการระเหิดของโมเลกุลน้ำออกจากตัวอย่างภายใต้สภาวะความดันต่ำกว่าบรรยากาศ [50], [52]-[53] โดยขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโมเลกุลน้ำได้ประมาณ 70-90% [53] ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิ การระเหิดของโมเลกุลน้ำภายในตัวอย่างจะเริ่มจากพื้นผิวด้านบนสุดของตัวอย่าง และผ่านชั้นต่างๆ ลงไปจนถึงพื้นผิวด้านล่างของตัวอย่าง [53] ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิควรมีการรักษาความดันและอุณหภูมิของระบบให้ต่ำกว่าจุดร่วมสามเพื่อให้ตัวอย่างสามารถเกิดการระเหิดได้อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอภายในตัวอย่างชั้นถัดไป [50], [53]

2.3.3 กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นทุติยภูมิ (Secondary drying)

กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นทุติยภูมิใช้ในการกำจัดโมเลกุลของน้ำที่คงเหลืออยู่ในตัวอย่างภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นปฐมภูมิ [50], [53] ขั้นตอนนี้จะมีการกำจัดโมเลกุลน้ำจนเหลือความชื้นภายในตัวอย่างประมาณ 5-10 % [53] ผ่านกระบวนการคายซับโมเลกุลของน้ำ (Desorption) ซึ่งเกิดขึ้นจากการเพิ่มอุณหภูมิในระบบ [50], [53] ทั้งนี้ภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งขั้นทุติยภูมิ จำเป็นจะต้องมีความระมัดระวังในการจัดเก็บตัวอย่างให้สัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด เนื่องจากตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็งมีพื้นที่ผิวสำหรับการดึงน้ำจากอากาศเข้ามาในตัวอย่างได้สูง การสัมผัสกับอากาศทำให้ตัวอย่างดูดซับความชื้น เสี่ยงต่อการเสื่อมสภาพ อาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างผ่านการเกิดปฏิกิริยาเคมี [53]

ภายหลังการทำแห้งแบบแช่แข็ง หากต้องการนำตัวอย่างที่ถูกจัดเก็บมาใช้สามารถทำได้ง่ายโดยการคืนความชุ่มชื้น (Rehydrate) ตัวอย่างด้วยน้ำ บัฟเฟอร์ อาหารเหลว หรือน้ำเกลือตามความเหมาะสม [53] ตัวอย่างในรูปแบบแห้งที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งทั้ง 3 ขั้นตอน ควรแห้ง ปลอดภัย และเกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเพียงเล็กน้อย [53]

กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งมีการนำไปประยุกต์ใช้หลายด้าน ทั้งด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเกษตร โดยเฉพาะการนำไปใช้ในการรักษาตัวอย่างชีวโมเลกุล (เช่น แบททีเรีย ไวรัส และ โปรตีน) ที่ง่ายต่อการเสื่อมสภาพในระหว่างกระบวนการจัดเก็บและขนส่ง [50], [53], [56] โดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเป็นวิธีการทำแห้งที่ใช้อุณหภูมิต่ำ ที่มีประสิทธิภาพ ข้อดีหลายด้าน ได้รับความนิยมนอย่างมาก เมื่อเทียบกับการทำแห้งแบบอื่นที่ใช้อุณหภูมิสูงกว่าทำให้ตัวอย่างเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ การทำแห้งแบบแช่แข็งถูกนำไปประยุกต์ใช้กับสารชีวโมเลกุลทั้งในด้านการยืดระยะเวลาการจัดเก็บรักษาและการขนส่งสารชีวโมเลกุล เนื่องจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งสามารถรักษาคุณสมบัติและโครงสร้างของตัวอย่างชีวโมเลกุลได้ดี ลดการเกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เนื่องจากปริมาณความชื้นในตัวอย่างลดลง ทำให้ลดโอกาสในการเกิดปฏิกิริยาเคมี เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และมีประสิทธิภาพในการรักษาความเสถียรของตัวอย่างผ่านการลดการเคลื่อนที่ของโมเลกุล [49]-[50], [53] ถึงแม้ว่าบางครั้งการนำตัวอย่างในรูปแบบสารละลายมาใช้จะสามารถทำได้ง่ายกว่าตัวอย่างในรูปแบบแห้งแต่การขนส่งและการจัดเก็บตัวอย่างในรูปแบบแห้งสามารถทำได้ง่าย และสะดวกต่อการขนส่งและการจัดเก็บตัวอย่างมากกว่า [56]

การศึกษาในงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งแบบทีรีโอฟาจ ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุล มีความไวต่อปัจจัยภายนอก และกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งก่อให้เกิดความเครียดระหว่างกระบวนการสูง เช่น ความเครียดที่เกิดจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็ง การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของสารละลาย การเปลี่ยนแปลงของความดัน pH และอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง [15]-[16], [53] ทำให้สารคงประสิทธิภาพถูกนำมาใช้เป็นไครโอโพรเทกแทนต์ (Cryoprotectant) เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งผ่านการลดผลกระทบที่เกิดจากความเครียด และเอาชนะข้อจำกัดต่างๆ ระหว่างการจัดเก็บรักษาฟาจ ไม่ว่าจะเป็นความไวต่อปัจจัยภายนอกและสภาพแวดล้อม อายุการจัดเก็บรักษาที่ค่อนข้างสั้น

ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับการนำกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเข้าไปใช้ในการรักษาความเสถียรของฟาจ M13 ของ Zhang และคณะ พบว่าการจัดเก็บฟาจในรูปแบบแห้งมีระยะเวลาในการจัดเก็บนานกว่าการจัดเก็บฟาจ M13 ในรูปแบบสารละลาย นอกจากนี้ยังพบความสำคัญของการใช้สารคงประสิทธิภาพร่วมกับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ช่วยให้ฟาจสามารถรักษา

ความสามารถในการติดเชื้อได้ดี [57] จากการศึกษาส่วนใหญ่ พบว่าการใช้สารคงประสิทธิภาพร่วมกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ สามารถรักษาความเสถียรหรือระยะเวลาการจัดเก็บได้ยาวนานขึ้น เมื่อเทียบกับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจโดยไม่เติมสารคงประสิทธิภาพ [17], [22], [58]

2.4 สารคงประสิทธิภาพ (Excipient)

สารคงประสิทธิภาพถือเป็นสารเคมีที่สำคัญและนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการคงสภาพแบคทีรีโอฟาจ เนื่องจากสารคงประสิทธิภาพสามารถช่วยรักษาสภาพของฟาจ เมื่อฟาจต้องเผชิญกับความเครียดระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ตัวอย่างสารคงประสิทธิภาพที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ โปรตีน พอลิเมอร์ น้ำตาล และน้ำตาลแอลกอฮอล์ [18], [39] โดยในงานวิจัยสนใจการนำน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์มาประยุกต์ใช้เป็นไครโอโพรเทกแทนต์ (Cryoprotectant) สำหรับรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ และปกป้องฟาจจากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง [16]–[18], [21]–[22], [39] เนื่องจากน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์เป็นสารคงประสิทธิภาพที่มีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยในที่นี้เนื้อหาของสารคงประสิทธิภาพจะกล่าวถึงแต่น้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ถูกใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 'ได้แก่' กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอล

ผลการศึกษาจากงานวิจัยจำนวนมากค้นพบว่าน้ำตาลส่วนใหญ่เป็นสารคงประสิทธิภาพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเสถียรและคงโครงสร้างของฟาจและโปรตีนได้ดีในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง [16]–[18], [21]–[22], [39] ตัวอย่างการศึกษาของ Zhang และคณะ และ Ohtake และคณะ รวบรวมข้อมูลของผลการศึกษาเกี่ยวกับน้ำตาล พบว่าน้ำตาลส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพสำหรับการนำไปใช้ในการรักษาความเสถียรและคงโครงสร้างของฟาจและโปรตีน โดยความสามารถในการรักษาประสิทธิภาพของฟาจและโปรตีนของน้ำตาลขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของน้ำตาล โครงสร้างของฟาจ และโครงสร้างของโปรตีน [18], [39] โดยทั้ง 2 งานมีการอธิบายกลไกของน้ำตาลในการปกป้องโครงสร้างของฟาจและโปรตีนที่น่าจะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยอ้างอิงจากงานวิจัยที่เคยทำมาก่อนหน้า ซึ่งอธิบายไว้ว่าน้ำตาลรักษาความเสถียรและโครงสร้างของฟาจผ่านการสร้างพันธะไฮโดรเจนแทนที่อันตรกิริยาของโปรตีนและน้ำระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง พันธะใหม่ที่เกิดขึ้นช่วยลดผลกระทบจากความเครียดระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

น้ำตาล ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน (C) ธาตุออกซิเจน (O) และไฮโดรเจน (H) มีสูตรโมเลกุลทั่วไป คือ $C_n(H_2O)_n$ โดย n = จำนวนของอะตอม คุณสมบัติทั่วไปของน้ำตาล ได้แก่ หวาน ไม่มีสี ความสามารถในการละลายน้ำสูง น้ำตาลสามารถแบ่งได้เป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides) และน้ำตาลเชิงซ้อน (Polysaccharides) [59]

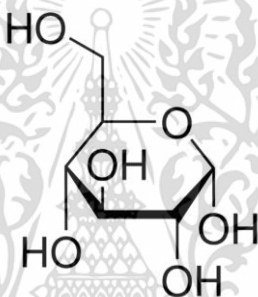
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides)

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อยที่สุดของคาร์โบไฮเดรต และไม่สามารถถูกย่อยด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ให้เล็กลงได้ สูตรโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ $(\text{CH}_2\text{O})_n$ โดย n = จำนวนของอะตอม โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวประกอบด้วยคาร์บอนเชื่อมกับไฮโดรเจนติดกับหมู่ฟังก์ชัน โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถอยู่ได้ทั้งรูปแบบโซ่ตรงและโซ่ปิด [59]–[61] น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ทำการศึกษา ได้แก่ กลูโคส และกาแลคโตส

2.4.1.1 กลูโคส (Glucose)

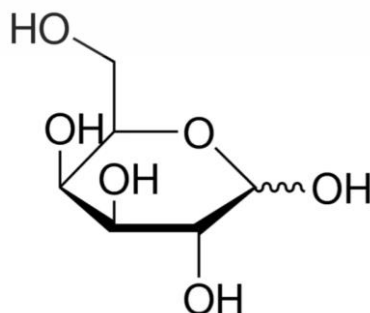
กลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอนทั้งหมด 6 อะตอม มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ [60] โครงสร้างของกลูโคสแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างโครงสร้างของกลูโคส [62]

2.4.1.2 กาแลคโตส (Galactose)

กาแลคโตสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอนทั้งหมด 6 อะตอม มีสูตรโมเลกุลเหมือนกลูโคส สามารถแยกความแตกต่างของกลูโคสและกาแลคโตสตามการจัดเรียงตัวของโมเลกุล [63] ตัวอย่างโครงสร้างของกาแลคโตสแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ตัวอย่างโครงสร้างของกาแลคโตส [64]

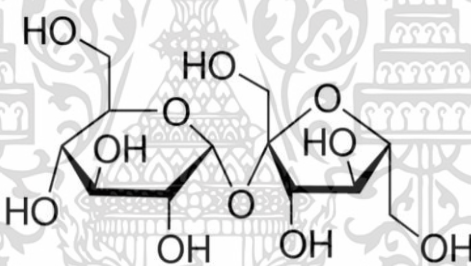
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides)

น้ำตาลโมเลกุลคู่เกิดจากการเชื่อมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่เชื่อมพันธะคู่ระหว่างอะตอมของออกซิเจนกับคาร์บอน 2 อะตอม โดยน้ำตาลโมเลกุลคู่เกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่น (Condensation reaction) ของ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองตัว ทำให้เกิดการสูญเสียโมเลกุลน้ำระหว่างการเกิดปฏิกิริยา สูตรทั่วไปของ น้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ สามารถแยกความแตกต่างของน้ำตาลโมเลกุลคู่แต่ละชนิดตามการ จัดเรียงตัวของโมเลกุล [59], [61], [65] น้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ทำการศึกษา ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส และ แลคโตส

2.4.2.1 ซูโครส (Sucrose)

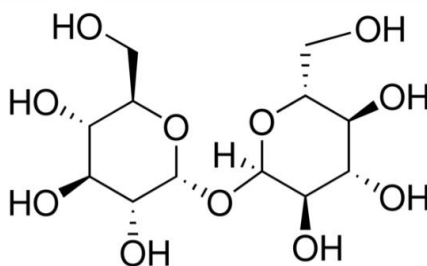
ซูโครส ประกอบด้วยกลูโคสกับฟรุกโทส (Fructose) เชื่อมด้วยพันธะ ไกลโคซิดิก มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ [59], [66]-[67] ตัวอย่างโครงสร้างของซูโครสแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ตัวอย่างโครงสร้างของซูโครส [68]

2.4.2.2 ทรีฮาโลส (Trehalose)

ทรีฮาโลส ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิก มีสูตร โมเลกุล คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ [66]-[67], [69]-[70] ตัวอย่างโครงสร้างของทรีฮาโลสแสดงในรูปที่ 2.8

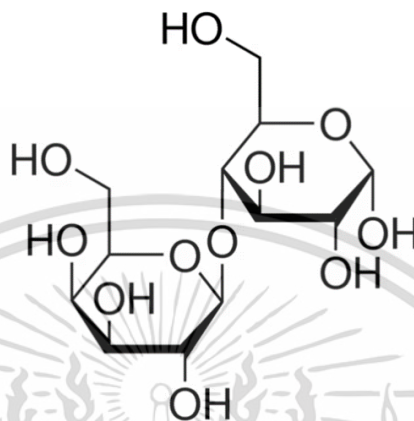


รูปที่ 2.8 ตัวอย่างโครงสร้างของทรีฮาโลส [71]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.3 แลคโตส (Lactose)

แลคโตส ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโตสเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิก มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ [67] ตัวอย่างโครงสร้างของแลคโตสแสดงในรูปที่ 2.9



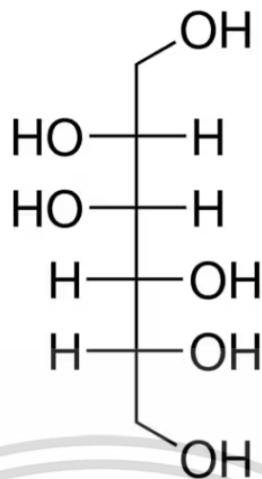
รูปที่ 2.9 ตัวอย่างโครงสร้างของแลคโตส [72]

2.4.3 น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Sugar alcohols)

น้ำตาลแอลกอฮอล์ถือเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคือน้ำตาลแอลกอฮอล์ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของน้ำตาล นิยมใช้สำหรับเป็นสารทดแทนความหวานจากน้ำตาล มีการศึกษาด้านการปกป้องสารชีวโมเลกุลสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ผ่านกระบวนการทำแห้งหลายประเภท เช่น การทำแห้งแบบแช่แข็ง การทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากแมนนิทอลสามารถทำหน้าที่เป็นสารคงประสิทธิภาพได้ดี ถึงแม้ว่าจะมีบางการศึกษาที่ได้ผลลัพธ์ต่างออกไป [39] โดยน้ำตาลแอลกอฮอล์มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับน้ำตาลรวมกับแอลกอฮอล์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) อยู่ในโครงสร้าง ได้มาจากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือคือน้ำตาลโมเลกุล คือ $(CHOH)_nH_2$ โดย $n =$ จำนวนของอะตอม [73]-[74]

2.4.3.1 แมนนิทอล (Mannitol)

แมนนิทอล (Mannitol) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนทั้งหมด 6 อะตอม มีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{14}O_6$ โดยแมนนิทอลสามารถเตรียมได้จากน้ำตาลฟรักโทส (Fructose) และแมนโนส (Mannose) ผ่านปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) [67], [73] ตัวอย่างโครงสร้างของแมนนิทอลแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างโครงสร้างของแมนนิทอล [75]

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำสารคงประสิทธิภาพทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอลเข้ามาประยุกต์ใช้สำหรับการจัดเก็บรักษาฟางมีดังนี้

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คุณสมบัติทั่วไปมีความยืดหยุ่นทางโครงสร้างน้อยกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ ส่งผลให้มีโอกาสสร้างความเสียหายต่อโครงสร้างฟางระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งมากกว่า น้ำตาลโมเลกุลคู่ ดังนั้นผลการทดสอบความเสถียรของฟางที่ใช้ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นสารคงประสิทธิภาพส่วนใหญ่จึงแยกว่าผลที่ได้จากน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น การศึกษาของของ Manohar และ Ramesh ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของกลูโคส ซูโครส และแมนนิทอลในการจัดเก็บรักษาฟาง 3 ชนิด ได้แก่ ฟาง *Escherichia* ECP311 ฟาง *Klebsiella* KPP235 และฟาง *Enterobacter* ELP140 ที่อุณหภูมิ 4 และ 37 °C พบว่าภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง กลูโคสมีความสามารถในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟางเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะผลที่ได้จากฟาง ELP140 และผลการทดสอบประสิทธิภาพของกลูโคสมีความสอดคล้องกับผลของแมนนิทอล ขณะที่การใช้ซูโครส พบว่าน้ำตาลซูโครสรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟางทั้ง 3 ชนิดได้ดี นอกจากนี้การทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะเวลาในการจัดเก็บรักษาฟาง พบว่าซูโครสสามารถรักษาความเสถียร และยืดอายุการจัดเก็บรักษาฟางได้ดีทั้งการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 37 °C ภายในระยะเวลา 20 เดือน [17] ขณะที่ผลการศึกษาของ Manohar และคณะ พบว่ากลูโคสค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพฟางระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบประสิทธิภาพของฟาง *Escherichia* myPSH1131 โดยใช้กลูโคสและซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 M เป็นสารคงประสิทธิภาพสำหรับการยืดอายุการจัดเก็บรักษาฟาง myPSH1131 ซึ่งจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 M สามารถรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟางเป็นระยะเวลา 10 เดือนโดยมีความเข้มข้นของฟางลดลงประมาณ 1 log นอกจากนี้ซูโครสความเข้มข้น

0.5 และ 1 M ผลการทดสอบ พบว่าซูโครสสามารถรักษาความเข้มข้นของฟางเป็นระยะเวลา 20 เดือน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือน มีความเข้มข้นของฟาจลดลงน้อยกว่า 2 log ขณะที่แมนนิทอลความเข้มข้น 0.5 และ 1 M แสดงความสามารถในการรักษาความเข้มข้นของฟาจได้ต่ำมาก [76] นอกจากนี้ Qin และคณะ ทดสอบประสิทธิภาพของกาแลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวถูกนำมาใช้ในการทำแห้งแบบแช่แข็ง แบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* เพื่อรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ผลการศึกษาของ กาแลคโตสที่ความเข้มข้น 3 6 9 12 และ 15% ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกาแลคโตสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 17.05% เป็น 42.69% ที่ความเข้มข้นของกาแลคโตสเพิ่มขึ้นจาก 3% จนถึง 15% (อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย = แบคทีเรียที่รอดชีวิตก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง/แบคทีเรียที่รอดชีวิตภายหลังจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง $\times 100$) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแบคทีเรียมีการเพิ่มขึ้นมากที่สุดจาก 1.7×10^{10} CFU/g เป็น 1.09×10^{11} CFU/g ที่ความเข้มข้นของกาแลคโตสเพิ่มขึ้นจาก 3% จนถึง 12% สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย คือความเข้มข้นของกาแลคโตสเท่ากับ 15% และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย คือความเข้มข้นของกาแลคโตสเท่ากับ 12% [77]

งานวิจัยที่ศึกษาน้ำตาลโมเลกุลคู่ส่วนใหญ่ พบว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่มีประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อและคงสภาพฟาจได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะซูโครสและทรีฮาโลส เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำตาลคู่ ได้แก่

1. โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลคู่ มีความยืดหยุ่นมากกว่าโครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้น้ำตาลโมเลกุลคู่ ช่วยรองรับโครงสร้างของฟาจได้ดี และไม่ทำลายโครงสร้างธรรมชาติของฟาจ
2. ค่าอุณหภูมิสภาพแก้ว (Glass transition temperature) ของน้ำตาลโมเลกุลคู่สูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ช่วยในการจำกัดการเคลื่อนที่ของอนุภาคฟาจ ส่งผลให้น้ำตาลโมเลกุลคู่ สามารถคงความสามารถในการติดเชื้อของฟาจได้ดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ตัวอย่างการศึกษาสารคงประสิทธิภาพ ประเภทน้ำตาลโมเลกุลคู่โดย Dini และคณะ ทดสอบเกี่ยวกับประสิทธิภาพของฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการศึกษาฟาจ CA933P ร่วมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 M พบว่าซูโครสที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 M ให้ความเข้มข้นฟาจสูงสุด โดยการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นจาก 0.1 ถึง 0.5 M ของซูโครส มีแนวโน้มทำลายฟาจ [78] การศึกษาของ González-Menéndez และคณะ มีการศึกษาความเสถียรของฟาจ 4 ชนิด ได้แก่ philPLA88 philPLA35 philPLA-RODI และ philPLA-C1C โดยมีการใช้ซูโครสเป็นสารคงประสิทธิภาพท่ามกลางนมพร่องไขมันเนย (Skim milk) และซอร์บิทอล (Sorbitol) จัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 24 เดือน พบว่าซูโครสเป็นสารคงประสิทธิภาพที่มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นของฟาจได้ตรงจากนมพร่องไขมันเนย และสามารถรักษาความเสถียรได้ดีตลอดระยะเวลา 24 เดือน (ความเข้มข้นฟาจทุกชนิดของซูโครสลดลงน้อยกว่า 2.5 log) [79] นอกจากนี้

การทดสอบประสิทธิภาพของซูโครส และทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 M ร่วมกับแมนนิทอล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการรักษาความเข้มข้นของฟาจ *Staphylococcus aureus* ISP โดยจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 37 เดือนของ Merabishvili และคณะ พบว่าซูโครสและทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นของฟาจไว้ได้นานถึง 37 เดือน โดยมีการลดลงของฟาจน้อยกว่า 2 log ขณะที่ซูโครสและทรีฮาโลสที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 M พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจมากกว่า 4 log ภายในระยะเวลาเท่ากัน ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจประมาณ 4 log ภายในระยะเวลา 27 เดือน และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 M แทบไม่พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ภายหลังจากมีการศึกษาความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลสเพิ่มเติมที่ความเข้มข้น 0.3 0.5 0.8 และ 1 M เป็นระยะเวลา 27 เดือน เนื่องจากซูโครสและทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลที่ผ่านการทดสอบในช่วงต้นแล้วว่าไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นของฟาจได้ดี ผลของซูโครสและทรีฮาโลสในทุกความเข้มข้น พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจประมาณ 1 log ภายในระยะเวลา 27 เดือน ยกเว้นซูโครสและทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.3 M พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจประมาณ 2 log ภายในระยะเวลา 27 เดือน [22], [80]

ถัดมาตัวอย่างผลการศึกษาของแลคโตสและทรีฮาโลสโดย Vandenheuvel และคณะ ทดสอบเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพโดยการใช้กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) กับฟาจ *Pseudomonas* LUZ19 และฟาจ *Staphylococcus* Romulus พบว่าแลคโตสเป็นน้ำตาลที่ไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ โดยความเข้มข้นฟาจ LUZ19 ลดลงประมาณ 4 log และฟาจ Romulus ลดลงประมาณ 8 log ขณะที่ผลที่ได้จากทรีฮาโลสพบการลดลงของฟาจ LUZ19 ประมาณ 0.02 log และฟาจ Romulus ประมาณ 2.58 log ดังนั้นผลการศึกษาของ Vandenheuvel และคณะ สามารถสรุปได้ว่า ทรีฮาโลสถือเป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจได้ดี โดยผลการทดสอบความเข้มข้นฟาจที่ได้จากวิธีการทดสอบด้วยพลาควา (Plaque assay) ของแลคโตสและทรีฮาโลสมีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการส่องฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) ซึ่งพบว่าโครงสร้างของฟาจในแลคโตสถูกทำลาย ขณะที่โครงสร้างของฟาจในทรีฮาโลสอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ทำให้แลคโตสและทรีฮาโลสมีประสิทธิภาพในการคืนสภาพฟาจต่างกัน [81] ถึงแม้ว่าผลการศึกษารคงสภาพฟาจของแลคโตสข้างต้น บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการคงสภาพฟาจที่ต่ำ แต่การศึกษา Golshahi และคณะ พบว่าแลคโตสมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพของฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ KS4-M และ Φ KZ ร่วมกับการบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (Mixer mill) โดยมีการใช้แลคโตสและแลคโตเฟอร์ริน (Lactoferrin) เป็นสารคงประสิทธิภาพสำหรับการทำผงฟาจตามอัตราส่วนของแลคโตส:แลคโตเฟอร์ริน = 60:40%(w/w) พบว่าการทดสอบภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ KS4-M มีการลดลงของความเข้มข้นประมาณ 2 log และฟาจ Φ KZ มีการลดลงของความเข้มข้นประมาณ 1 log หลังจากนั้น

ทำการทดสอบการจัดเก็บภายในระยะเวลา 3 เดือนที่อุณหภูมิ 4 และ 22 °C พบว่าผงฟาจในสูตรแลค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตน:แลคโตเฟอริน = 60:40%(w/w) มีความเสถียรดีมาก โดยพบการลดลงของความเข้มข้นฟาจทั้งสองชนิดน้อยกว่า 1 log ตลอดระยะเวลา 3 เดือน [82] ซึ่งผลการศึกษาของ Golshahi และคณะที่พบว่าแลคโตสเป็นสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อฟาจสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาของ Chang และคณะ โดย Chang และคณะ ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยฟาจ PEV1 PEV20 และ PEV61 ที่มีความสามารถในการติดเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* การศึกษามีการใช้ทรีฮาโลส แลคโตส และลิวซีน (Leucine) ร่วมกับการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทาคุชิ (Taguchi method) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการหาสารคงประสิทธิภาพที่มีความเด่นในการรักษาสภาพฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย เปรียบเทียบระหว่างทรีฮาโลส และแลคโตส พบว่าสูตรการทำแห้งแบบพ่นฝอยของฟาจในทรีฮาโลสหรือแลคโตสผสมกับลิวซีน มีความเข้มข้นฟาจลดลงน้อยกว่า 1 log นอกจากนี้ยังพบว่าแลคโตสมีความเด่นกว่าทรีฮาโลสด้านการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ [83]

งานวิจัยที่กล่าวถึงน้ำตาลแอลกอฮอล์เกี่ยวกับแมนนิทอลส่วนใหญ่ พบว่าแมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพที่มีความสามารถในการรักษาความเสถียรของฟาจได้ดี [17], [22], [76], [80] จึงมีการแนะนำในหลายการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่น โดยเฉพาะน้ำตาลโมลกุลคู่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาความเสถียรของแมนนิทอล เช่น การศึกษาของ Leung และคณะ ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำแห้งแบบพ่นฝอยฟาจ *Pseudomonas* PEV2 เพื่อรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารคงประสิทธิภาพที่ใช้ได้แก่ ทรีฮาโลส แมนนิทอล และลิวซีน ทดสอบการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ภายในการศึกษามีการควบคุมอัตราส่วนของลิวซีนไว้ที่ความเข้มข้น 20%(w/w) และมีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของทรีฮาโลสและแมนนิทอลตั้งแต่ 0 20 40 และ 80%(w/w) โดยสูตรสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอยฟาจ PEV2 สามารถแบ่งได้ดังนี้ 1. ทรีฮาโลส:แมนนิทอล:ลิวซีน = 80:0:20%(w/w) 2. ทรีฮาโลส:แมนนิทอล:ลิวซีน = 60:20:20%(w/w) 3. ทรีฮาโลส:แมนนิทอล:ลิวซีน = 40:40:20%(w/w) 4. ทรีฮาโลส:แมนนิทอล:ลิวซีน = 60:40:20%(w/w) นอกจากนี้ Leung และคณะ ยังทำการศึกษาเกี่ยวกับความชื้นสัมพัทธ์ (Relative humidity) ที่ 0 22 และ 60% ที่อุณหภูมิจัดเก็บ 4 °C โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นของฟาจทุกๆ 1 3 และ 12 เดือน จากการสังเกต พบว่าสูตรในการทำแห้งแบบพ่นฝอยฟาจ PEV2 ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 0 และ 22% เมื่อความเข้มข้นของทรีฮาโลสมากกว่า 40%(w/w) พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจประมาณ 1.3 log ตลอดระยะเวลาการจัดเก็บ 12 เดือน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้แมนนิทอลที่ความเข้มข้นมากกว่า 60% ส่งผลเสียต่อความเข้มข้นฟาจ PEV2 โดยแนวโน้มการเพิ่มความเข้มข้นของแมนนิทอลในสูตรการทำแห้งฟาจที่ความเข้มข้นมากกว่า 60% ทำให้ความเข้มข้นฟาจลดลง ขณะที่เมื่อความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 60% พบว่าสูตรการทำแห้งฟาจ 1 3 และ 4 ภายใต้อายุการจัดเก็บ 3 เดือน และ 12 เดือน มีการลดลงของความเข้มข้นฟาจค่อนข้างสูง โดยเฉพาะที่การจัดเก็บ 12 เดือนที่พบการลดลงของความเข้มข้นฟาจประมาณ 7.5 log [84] โดยผลการศึกษเกี่ยวกับแมนนิทอลสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang และคณะ ซึ่งทำการศึกษการทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แห้งแบบแช่แข็งฟาจ M13 โดยการใช้ซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลในสภาวะ 4 °C พบว่าสูตรที่มีการใช้ซูโครสและทรีฮาโลสส่งผลดีเมื่อเทียบกับแมนนิทอล โดยเมื่อมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการผสมทรีฮาโลสกับแมนนิทอล พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแมนนิทอลเพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มข้นฟาจลดลง ขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของทรีฮาโลส ช่วยเพิ่มความเข้มข้นฟาจ [57] สอดคล้องกับผลสรุปจากหลายงานวิจัยที่พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจของแมนนิทอลได้จากการใช้แมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่น [39]

2.5 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM)

วิธีการพื้นผิวตอบสนองเป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาแบบจำลองและสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบกระบวนการที่สามารถแก้ปัญหาและตอบโจทย์ความต้องการ [85] นอกจากนี้วิธีการพื้นผิวตอบสนองยังมีความสามารถในการสำรวจความสำคัญและความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ของกระบวนการ [85] การประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองสามารถช่วยลดความซับซ้อนของงาน ประหยัดทรัพยากร เวลา และแรงงานมากยิ่งขึ้น เนื่องจากวิธีการพื้นผิวตอบสนองให้ผลลัพธ์ที่มีประสิทธิภาพภายใต้จำนวนการทดลองที่น้อยกว่า โดยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งในที่นี้คือวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนถูกนำมาใช้ออกแบบการทดลองเพื่อพัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่มีประสิทธิภาพ โดยวิธีการพื้นผิวตอบสนองสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลักๆ ได้แก่ วิธีการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design) และวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design)

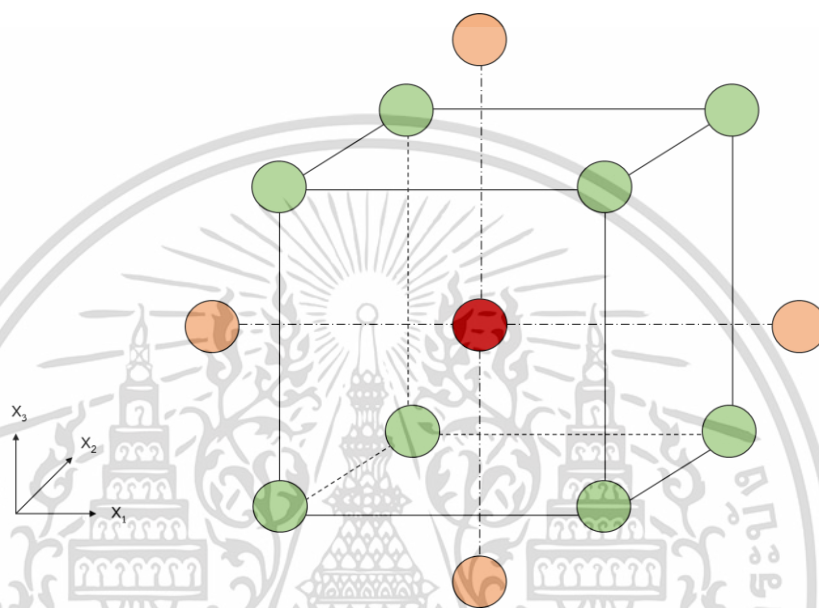
2.5.1 วิธีการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design; CCD)

วิธีการออกแบบส่วนประสมกลางส่วนใหญ่เป็นการทดลองตามลำดับขั้น (Sequential experiment) นิยมศึกษาต่อภายหลังการคัดกรองปัจจัยที่ไม่สำคัญออกด้วยการทดลองแฟคทอเรียลแบบ 2^k (2^k Factorial design) หรือการทดลองแฟคทอเรียลบางส่วน (Fractional factorial design) ด้วย Resolution V โดย k คือ จำนวนปัจจัยที่ศึกษา โครงสร้างของวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางแสดงในรูปที่ 2.11 ประกอบด้วยโครงสร้างของการทดลองแฟคทอเรียลรวมกับจุดแกน (Axial point) ทั้งหมดจึงประกอบด้วยจุดศูนย์กลาง (Center Point) จุดมุม (Corner point) และจุดแกน (Axial point)

วิธีการออกแบบส่วนประสมกลางมีปัจจัยในกระบวนการศึกษาอย่างน้อย 2 ปัจจัย และระดับการทดลองสำหรับแต่ละปัจจัยทั้งหมด 5 ระดับ ได้แก่ $-\alpha$ -1 0 $+1$ และ α โดย α คือ ตำแหน่งของจุดแกน ส่วนตำแหน่งของระดับอื่นได้มาจากการทดลองแฟคทอเรียล ยกเว้นวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางชนิด Face-centered (Face-centered central composite design) ที่ต้องการเพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 ระดับการทดลองสำหรับแต่ละปัจจัย ได้แก่ -1 0 และ +1 โดยข้อเสียของวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางที่พบได้บ่อย คือภายในการทดลองหรือกระบวนการมักมีการทดลองที่เกินขอบเขตช่วงที่กำหนดไว้ในการศึกษา ซึ่งเกิดจากการมีจุดแกนอยู่ในโครงสร้างของวิธีการออกแบบส่วนประสมกลาง อาจทำให้การดำเนินการของการทดลองหรือกระบวนการมีความยากลำบาก และไม่สามารถดำเนินการได้ [85]-[86]

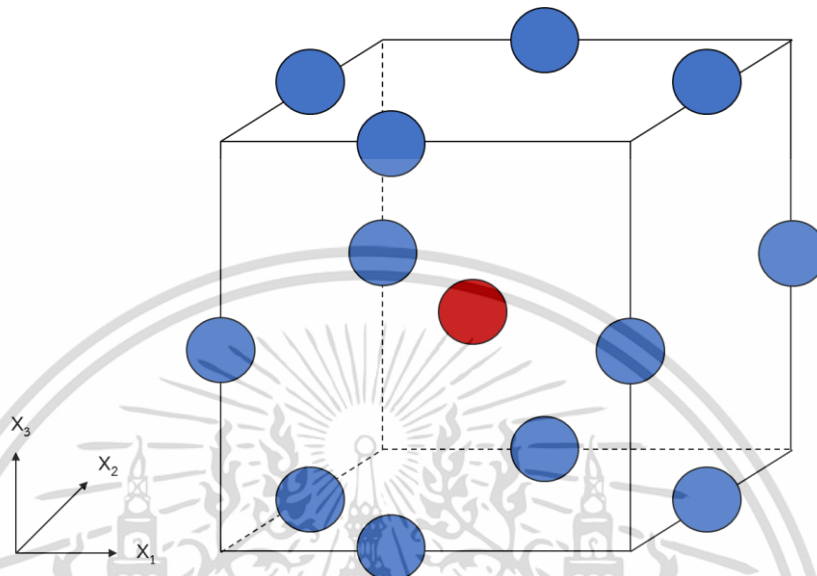


รูปที่ 2.11 ตัวอย่างโครงสร้างของวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางสำหรับ 3 ปัจจัย วงกลมสีแดง คือจุดศูนย์กลาง (Center Point) วงกลมสีเขียว คือจุดมุม (Corner point) และวงกลมสีส้ม คือจุดแกน (Axial point)

2.5.2 วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design; BBD)

วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเป็นหนึ่งในวิธีการออกแบบการทดลองที่ไม่จำเป็นต้องมีการทดลองแฟกทอเรียลมาก่อน โครงสร้างของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนแสดงในรูปที่ 2.12 ประกอบด้วยจุดศูนย์กลาง (Center Point) และจุดกึ่งกลาง (Middle point) ซึ่งได้มาจากโครงสร้างการทดลองแฟกทอเรียลแบบ 2^k ที่ไม่สมบูรณ์ร่วมกับจุดศูนย์กลาง (Center Point) โดย k คือ จำนวนปัจจัยที่ศึกษา วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนต้องการ 3 ระดับการทดลองสำหรับแต่ละปัจจัย ได้แก่ -1 0 และ +1 และมีอย่างน้อย 3 ปัจจัยในกระบวนการศึกษา ทั้งเทคนิคบ็อกซ์-เบห์นเคนและวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางมีความสามารถในการสร้างแบบจำลองเหมือนกัน และเป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่ได้ผลลัพธ์ไม่ต่างกันทางสถิติ ข้อดีของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน คือการดำเนินการทดลองหรือกระบวนการอยู่ในขอบเขตช่วงที่กำหนดไว้ในการศึกษา จึงไม่มีสถานะที่เกินขีดจำกัด (Extreme condition) ที่ไม่สามารถดำเนินการทดลองหรือกระบวนการได้ นอกจากนี้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนมีจำนวนการทดลองที่น้อยกว่า ซึ่งสามารถช่วยลดทรัพยากรค่าใช้จ่าย เมื่อเทียบกับวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางที่มักจะมีจำนวนลำดับการทดลองที่มากกว่า [85], [87]



รูปที่ 2.12 ตัวอย่างโครงสร้างของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับ 3 ปัจจัย วงกลมสีแดง คือจุดศูนย์กลาง (Center Point) วงกลมน้ำเงิน คือจุดกึ่งกลาง (Middle point)

วิธีการพื้นผิวตอบสนองถูกนำไปประยุกต์ใช้ด้านการพัฒนากระบวนการเกี่ยวกับสารชีวโมเลกุลอย่างหลากหลาย โดยเฉพาะการนำไปประยุกต์ใช้ด้านการยืดอายุการจัดเก็บตัวอย่างสารชีวโมเลกุล ตัวอย่างการศึกษาของ Yang และคณะ มีการนำวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเข้ามาใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเชื้อ *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 ที่มีความสามารถในการรักษาการรอดชีวิตของเชื้อได้ดี โดยระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งมีการใช้สารคงประสิทธิภาพพร้อมด้วย พบว่าสูตรที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเชื้อ *Bifidobacterium longum* ได้แก่ องค์ประกอบของ Human-like collagen (HLC) ทรีฮาโลส และกลีเซอรอลเท่ากับ 1.23 11.5 และ 4.65% ตามลำดับ พบปริมาณของเชื้อ *Bifidobacterium longum* สูงสุดเท่ากับ 1.07×10^9 CFU/ml [88] การศึกษาของ Velly และคณะ มีการนำวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเข้ามาพัฒนากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเชื้อ *Lactococcus lactis subsp. lactis* TOMSC1612 ร่วมกับการใช้สารไลโอโพรเทคแทนท์ (Lyoprotectant) ภายในระยะเวลาทดสอบ 3 เดือน ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ pH และเวลาในการเก็บตัวอย่างมาทดสอบ (Harvesting time) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเชื้อ *Lc. Lactis* TOMSC161 ได้แก่ อุณหภูมิ pH และเวลาในการเก็บเกี่ยวเท่ากับ 32 °C

6.2 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ มีผลลัพธ์ของค่าของปัจจัยตอบสนองเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งให้การ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของเชื้อ ความสามารถในการทนต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง และระยะเวลาการจัดเก็บสูงสุด [89] การศึกษาของ Shu และคณะ ศึกษาการใช้โครีโอโพรเทกแทนต์ (Cryoprotectant) เพื่อรักษาความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเพื่อยืดอายุการจัดเก็บรักษาเชื้อผ่านการนำวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเข้ามาใช้ เพื่อปรับเปลี่ยนสูตรของโครีโอโพรเทกแทนต์ โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ซูโครส แป้งละลายน้ำได้ (Soluble starch) และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ปัจจัยตอบสนอง ได้แก่ อัตราการรอดชีวิตและปริมาณของเชื้อ ภายหลังจากใช้วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน พบว่าสูตรสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ที่เหมาะสม ได้แก่ องค์ประกอบของซูโครส แป้งละลายน้ำได้ และกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ 17.17 และ 0.4% ตามลำดับ มีผลลัพท์ของอัตราการรอดชีวิตและปริมาณของเชื้อเท่ากับ 69.93% และ 2.79×10^{11} CFU/g ตามลำดับ [90] การศึกษาของ Ergin และคณะ ประยุกต์ใช้วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับกระบวนการทำไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Microencapsulation) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการ โดยฟาจ Felix O1 จะถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) และโซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate) จากวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำไมโครเอนแคปซูลเลชันฟาจ Felix O1 ประกอบด้วยค่าของปัจจัย Vibration frequency เท่ากับ 1.61 kHz ส่วนประกอบของโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 1.86% และส่วนประกอบของโซเดียมเคซีเนตเท่ากับ 3.26% ซึ่งสามารถให้ประสิทธิภาพในกระบวนการทำไมโครเอนแคปซูลเลชันสูงสุด [91] การศึกษาของ Nasran และคณะ ศึกษาการหาสูตรการทำแห้งแบบแช่แข็งเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* Kp10 ที่มีความเหมาะสมเพื่อช่วยยืดระยะเวลาในการจัดเก็บรักษาเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* สำหรับการรักษาโรคแอนแทรกโนส (Anthrax) ที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร โดยมีการนำวิธีการออกแบบส่วนประสมกลางเข้ามาประยุกต์ใช้สำหรับการหาสูตรการทำแห้งแบบแช่แข็งสำหรับสารคงประสิทธิภาพที่เหมาะสมด้วยส่วนผสมของแลตโตส นมพร่องไขมันเนย (Skim milk) และซูโครส พบว่าสูตรที่เหมาะสมที่สามารถรักษาปริมาณของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 5.839 log CFU/ml คือส่วนผสมของแลตโตส นมพร่องไขมันเนย และซูโครสเท่ากับ 10.20 และ 27.5% ตามลำดับ [92]

บทที่ 3

ขั้นตอนการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาฟาจผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ร่วมกับการใช้สารคงประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันการรอดชีวิตและความสามารถในการติดเชื้อของฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ขั้นตอนการศึกษาหลักๆ ประกอบด้วย

1. กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22
2. การหาความเข้มข้นคงเหลือของฟาจ C22
3. การประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงลึกระหว่างสารคงประสิทธิภาพและฟาจ
4. การประยุกต์ใช้วิธีการหุติ-เครเมอร์สำหรับจัดกลุ่มตัวอย่างเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือและสะดวกต่อการจัดกลุ่มตัวอย่างผ่านวิธีการทางสถิติ
5. การประยุกต์ใช้วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 โดยมีการศึกษาปัจจัยเพิ่มเติมนอกเหนือจากการศึกษาเกี่ยวกับสารคงประสิทธิภาพอย่างเดียว

3.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ โดยเกรดของสารเคมีปรากฏอยู่ในภาคผนวก ก ตาราง ก.7

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่
 - 1.1. อาหารเหลว CPG (CPG Media)
 - 1.2. อาหารวุ้นอ่อน CPG (CPG top agar)
 - 1.3. อาหารวุ้นแข็ง CPG (CPG agar)
2. สารคงประสิทธิภาพ ได้แก่
 - 2.1. กลูโคส (D-(+)-Glucose) สูตรโมเลกุล $C_6H_{12}O_6$
 - 2.2. กาแลคโตส (D-(+)-Galactose) สูตรโมเลกุล $C_6H_{12}O_6$
 - 2.3. ซูโครส (Sucrose) สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{22}O_{11}$
 - 2.4. ทรีฮาโลส ไดไฮเดรต (D-(+)-Trehalose dihydrate) สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$
 - 2.5. แลคโตส โมโนไฮเดรต (D-Lactose monohydrate) สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.6. แมนนิทอล (D-mannitol) สูตรโมเลกุล $C_6H_{14}O_6$
3. สารเคมีกลุ่มอื่นๆ ได้แก่
 - 3.1. กรดเคซามิโน (Casamino acids)
 - 3.2. เปปโตน (Peptone)
 - 3.3. ฐัน (Agar)
 - 3.4. 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)
 - 3.5. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl)
 - 3.6. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate; $MgSO_4$)
 - 3.7. Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)
 - 3.8. Deoxyribonuclease I (DNase I)
 - 3.9. Ribonuclease A (RNase A)
 - 3.10. แผ่นไมกา (Mica)
 - 3.11. (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTS)
 - 3.12. น้ำกลั่น (Distilled water)
 - 3.13. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
 - 3.14. ก๊าซไนโตรเจน

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. pH meter
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. ภาชนะ เช่น ขวดรูปชมพู่ และขวดเก็บสารเคมี
4. Magnetic stirrer
5. เครื่อง Autoclave โมเดล AMSCO LAB250 จาก STERIS
6. ตัวกรองแบบแผ่น (Membrane filter) ขนาดรูพรุน $0.2 \mu m$ ทำจาก Hydrophilic polyethersulfone จาก Pall
7. ตัวกรองแบบแผ่น (Membrane filter) ขนาดรูพรุน $0.45 \mu m$ ทำจาก Cellulose acetate จาก Corning
8. ตูยเย็น
9. ปิเปต (Pipette) หลายขนาด ใช้ร่วมกับปิเปตทิป (Pipette tip)
10. ไมโครทิวบ์ (Microtube)
11. เครื่องเขย่าสาร (Shaking incubator) โมเดล VS-8480SFN จาก VISION
12. เครื่อง Ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ปริมาตร 50 ml จาก Beckman Coulter
14. ขวดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge bottle) ปริมาตร 250 ml จาก Beckman Coulter
15. JA-14 rotor และ JA-30.50 Ti rotor จาก Beckman Coulter
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) โมเดล Avanti JXN-26 จาก Beckman Coulter
17. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
18. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
19. เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer) จาก Savant Super Modulyo
20. กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) จาก JPK-Bruker BioAFM Nanowizard 3

3.3 การเตรียมสารเคมี

3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหารเหลว CPG อาหารร่วนอ่อน CPG และอาหารร่วนแข็ง CPG โดยส่วนผสมปรากฏอยู่ในภาคผนวก ก ตาราง ก.1 ก.2 และ ก.3

1. Calibrate pH meter
2. เตรียมสารเคมีตามภาคผนวก ก ตาราง ก.1 ก.2 และ ก.3
3. เติมน้ำตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ในอาหารแต่ละชนิด
4. ปรับปริมาตรให้ถึงระดับที่ต้องการ
5. ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic stirrer
6. ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0
7. นำอาหารแบ่งใส่ภาชนะและฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นระยะเวลา 20 นาที
8. หลังการ Autoclave ให้เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่ 25 °C หรืออุณหภูมิห้อง

3.3.2 การเตรียมสารละลายความเข้มข้นสูง

สารละลายความเข้มข้นสูงที่ต้องเตรียม ได้แก่ สารคงประสิทธิภาพ (กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอล) NaCl MgSO₄ EGTA DNase I Rnase I และ APTS

1. ชั่งสารเคมีตามความเข้มข้นและปริมาตรที่ต้องการ โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)
2. ปรับปริมาตรให้ถึงระดับที่ต้องการด้วยน้ำปราศจากไอออน
3. กรองด้วยตัวกรองแบบแผ่นขนาดรูพรุน 0.2 µm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. หลังการกรอง ปิดฝาภาชนะให้แน่นและเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C สามารถนำไปเจือจางเพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

3.3.3 การเตรียมบัฟเฟอร์ 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)

การเตรียมบัฟเฟอร์ MES ที่ความแข็งแรงไอออน (Ionic strength) หรือ IS เท่ากับ 0.04 0.14 และ 0.24 M

1. Calibrate pH meter
 2. ชั่งสารเคมีตามความเข้มข้นและปริมาตรที่ต้องการโดยคำนวณจากค่าน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)
 3. ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6.0
 4. ปรับปริมาตรให้ถึงระดับที่ต้องการด้วยน้ำปราศจากไอออน
 5. กรองด้วยตัวกรองแบบแผ่นขนาดรูพรุน 0.2 μm
 6. ปิดฝาภาชนะของสารละลาย MES ที่มี pH = 6.0 ให้แน่นและเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C
- ภายหลังการเตรียม MES ที่มี pH = 6.0 จะมีการนำสารละลาย MES ที่มี pH = 6.0 ผสมกับ NaCl และ MgSO₄ เพื่อทำบัฟเฟอร์ MES ที่ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.04 0.14 และ 0.24 M โดยส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ที่ความแข็งแรงไอออนต่างๆ ปรากฏในภาคผนวก ก. ตาราง ก.4 ก.5 และ ก.6 เริ่มต้นการเตรียมจาก

1. ผสมสารละลาย MES ที่ pH = 6.0 กับสารละลาย NaCl และ MgSO₄ ตามความเข้มข้นและปริมาตรที่ต้องการ
2. ปรับปริมาตรให้ถึงระดับที่ต้องการด้วยน้ำปราศจากไอออน
3. กรองด้วยตัวกรองแบบแผ่นขนาดรูพรุน 0.2 μm ลงในภาชนะ และปิดฝาภาชนะให้แน่นและเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

3.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture)

เริ่มจากการบ่มเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอร์รัม (*Ralstonia solanacearum*) สายพันธุ์ RS3/1-1 (Race 1 Biovar 4) ในอาหารเหลว CPG ด้วยเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิ 28 °C ความเร็วรอบ 230 rpm ระยะเวลา 18–22 ชั่วโมง

3.5 การเพิ่มจำนวนแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage propagation)

1. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD₆₀₀) ด้วยเครื่อง UV-vis spectroscopy ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 2-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปิเปต 2 มิลลิลิตรของเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ที่ถูกบ่มข้ามคืนและ 2 มิลลิลิตรของสารละลาย MgSO₄ เข้มข้น 1 M ลงในอาหารเหลว CPG ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1 ลิตร
3. บ่มเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1 ลิตรที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ต่อที่อุณหภูมิ 28 °C ความเร็วรอบ 230 rpm ระยะเวลา 6-7 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่าสาร
4. เติม Phage lysate ความเข้มข้นประมาณ 10⁶-10⁷ PFU/ml ตามปริมาตรที่คำนวณได้จากค่า Multiplicity of infection (MOI) โดยกำหนดค่า MOI ประมาณ 0.05-0.1 สามารถคำนวณจากค่า OD₆₀₀ ตามสมการที่ 3.1 โดยผลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่า 1 OD₆₀₀ สามารถประมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 3×10⁸ CFU/ml

$$\text{ปริมาตรของ Phage lysate} = \frac{\text{OD}_{600} \times 3 \times 10^8 \times \text{MOI} \times \text{ปริมาตรของ Culture}}{\text{ความเข้มข้นของ Phage lysate}} \quad (3.1)$$

5. หลังจากการเติม Phage lysate ขั้นตอนที่ 4 ให้รอการเกิดกระบวนการเข้าเกาะเซลล์ของฟาจอย่างสมบูรณ์ (Phage adsorption) เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการบ่มเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ระยะเวลา 6-7 ชั่วโมงด้วยเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิ 28 °C ความเร็วรอบ 200 rpm

3.6 การทำแบคทีรีโอฟาจให้บริสุทธิ์ (Bacteriophage purification)

1. หลังจากการเติมฟาจ C22 ซึ่งอยู่ในวงศ์ *Podoviridae* และมีกลไกในการเพิ่มจำนวนของฟาจแบบไลติก (Lytic cycle) ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีการบ่มเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ที่ทิ้งไว้ระยะเวลา 6-7 ชั่วโมง ตามขั้นตอนที่ 5 หัวข้อ 3.5 จะสามารถสังเกตการเกิดการย่อยสลายของแบคทีเรีย (Bacterial lysis) โดยสังเกตจากเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture) มีเปลี่ยนจากสารละลายขุ่นเป็นสารละลายที่ใสขึ้น
2. เติม EGTA ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 2 ml ในสารละลายจากขั้นตอนที่ 1 และเขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิ 28 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง
3. เติม DNase I ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 20 µl และ RNase A ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 10 µl ลงในสารละลายในขั้นตอนที่ 2 หลังจากนั้นบ่มเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ต่อด้วยเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงในขนาดปริมาตร 250 ml ด้วย JA-14 rotor ที่อุณหภูมิ 4 °C และความเร็วรอบ 7,500 rpm เป็นระยะเวลา 45 นาทีเพื่อกำจัดเศษซากเซลล์ (Cell debris) ออก
5. กรองของเหลวเหนือตะกอน (Supernatant liquid) ผ่านตัวกรองแบบแผ่นขนาดรูพรุน 0.45 µm ด้วยปั๊มสุญญากาศ
6. หลังจากนั้นนำของเหลวเหนือตะกอนที่ผ่านการกรองใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย JA-30.50 Ti rotor ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 19,500 rpm ระยะเวลา 45 นาทีเพื่อตกตะกอนฟาจ
7. ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยงให้ทิ้งของเหลวเหนือตะกอนและเก็บตะกอนของฟาจไว้ หลังจากนั้นจะมีการละลายตะกอนฟาจด้วยบัฟเฟอร์ MES (IS = 0.14)
8. นำฟาจในบัฟเฟอร์ MES (IS = 0.14) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 19,500 rpm เป็นระยะเวลา 45 นาที
9. หลังจากขั้นตอนที่ 8 ให้ทิ้งของเหลวเหนือตะกอนและเก็บตะกอนของฟาจในบัฟเฟอร์ MES (IS = 0.14) ภายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ตะกอนฟาจอ่อนลง
10. ละลายตะกอนฟาจด้วยบัฟเฟอร์ MES (IS = 0.14) อีกรอบ หลังจากนั้นเก็บสารละลายฟาจไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

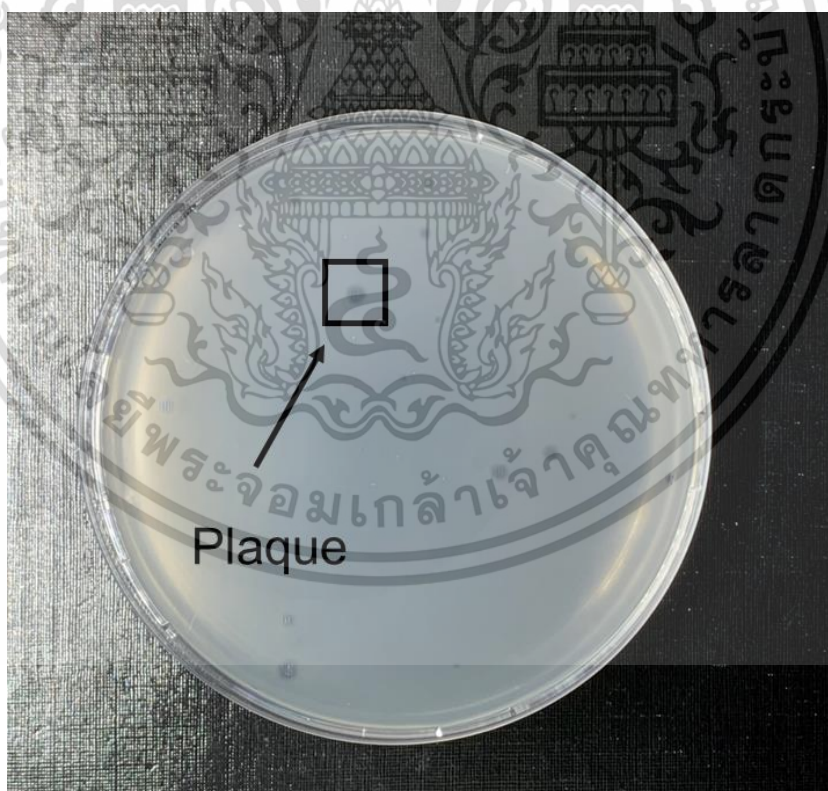
3.7 การหาความเข้มข้นของแบคทีริโอฟาจผ่านวิธีการทดสอบด้วยพลาคว (Plaque assay)

1. บ่มเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ในอาหารเหลว CPG ที่อุณหภูมิ 28 °C ความเร็วรอบ 230 rpm ด้วยเครื่องเขย่าสารทิ้งไว้ระยะเวลา 18–22 ชั่วโมง
2. ผสมสารละลายฟาจ C22 กับสารคงประสิทธิภาพ (ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส หรือ ฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอล) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
3. เจือจางสารละลายฟาจด้วยวิธี Serial dilution ในกรณีความเข้มข้นของฟาจมากเกินไป
4. ผสมสารละลายฟาจกับสารคงประสิทธิภาพแต่ละชนิดในขั้นตอนที่ 3 กับเชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม (*Ralstonia solanacearum*) ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว CPG ในขั้นตอนที่ 1 หลังจากนั้นบ่มทิ้งไว้ 45 นาทีเพื่อให้เกิดกระบวนการเข้าเกาะเซลล์ของฟาจอย่างสมบูรณ์ (Phage adsorption)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำส่วนผสมในขั้นตอนที่ 4 ผสมกับอาหารวุ้นอ่อน CPG ที่มีส่วนผสมของวุ้น 0.45%(w/v) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย หลังจากนั้นเทลงบนอาหารวุ้นแข็ง CPG ที่มีส่วนผสมของวุ้น 1.5%(w/v) ที่ได้เตรียมไว้ก่อนแล้วในงานเลี้ยงเชื้อ
6. รอส่วนผสมบนงานเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนที่ 5 แห้ง
7. บ่มงานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นระยะเวลา 18-20 ชั่วโมง เพื่อให้ฟาจเข้าไปติดเชื้อแบคทีเรีย โดยบริเวณที่แบคทีเรียถูกทำลายจะเกิดเป็นพื้นที่วงกลมใสๆ (Plaque) ดังปรากฏในรูปที่ 3.1 โดยสามารถหาความเข้มข้นฟาจจากการนับจำนวนพลาควาที่ปรากฏและคำนวณตามสมการที่ 3.2 ในหน่วยของ Plaque-forming unit (PFU) ต่อมิลลิลิตร (ml) [93] หลังจากนั้นจะถูกนำมาคิดเป็นร้อยละและหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

$$\text{ความเข้มข้นฟาจ} = \frac{\text{จำนวนของพลาควา}}{\text{Dilution factor} \times \text{ปริมาตรของไวรัส}} \quad (3.2)$$



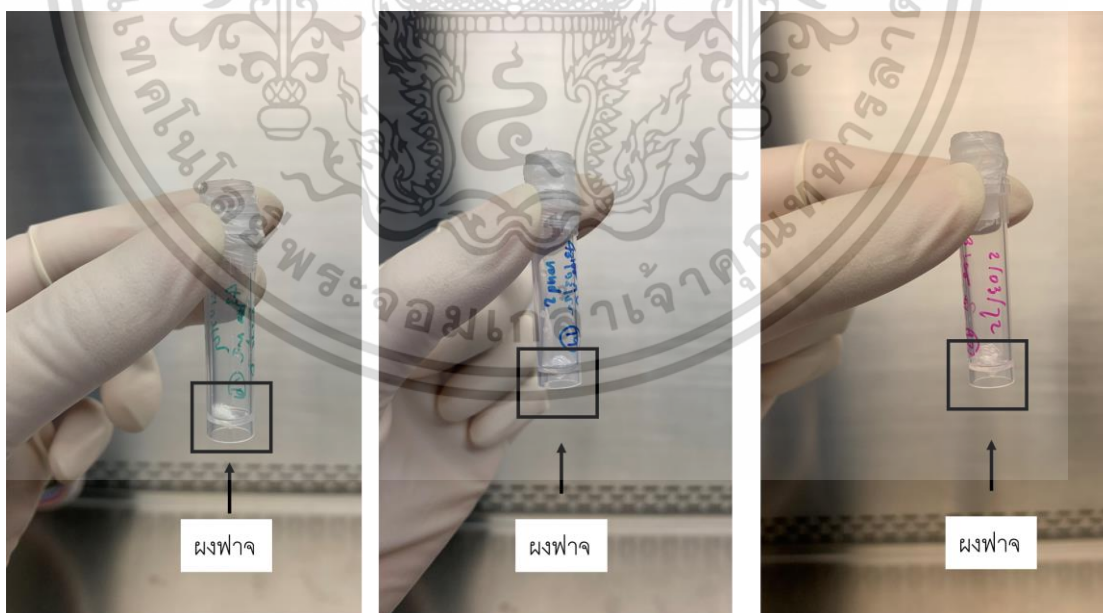
รูปที่ 3.1 ลักษณะของพลาควาจากวิธีการทดสอบด้วยพลาควา (Plaque assay)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การทำแห้งแบบแช่แข็งแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage lyophilization)

เริ่มกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งโดยการนำสารคงประสิทธิภาพที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าส่งผลดีต่อฟาจหลังจากการทำการทดสอบด้วยพลาควิดในขั้นตอนที่ 3.7 เพื่อหาความเข้มข้นฟาจคงเหลือ สารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อฟาจจะเป็นตัวแทนกลุ่มเข้ามาทดสอบต่อในกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยเริ่มจาก

1. ผสมสารละลายฟาจ C22 กับสารคงประสิทธิภาพที่เป็นตัวแทนกลุ่มเข้ามาทดสอบในกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง
2. บรรจุลงในหลอดไมโครทิวบ์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรและนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เป็นระยะเวลา 14-18 ชั่วโมง
3. หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -60°C ความดัน 0.1 mbar เป็นระยะเวลา 14-18 ชั่วโมง
4. หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ปิดหลอดไมโครทิวบ์อย่างแน่นหนา
5. จัดเก็บผงฟาจในหลอดไมโครทิวบ์ที่อุณหภูมิ 25°C และเติมน้ำปราศจากไอออน ก่อนการทำการทดสอบด้วยพลาควิด ในส่วนการทดลองของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ผงฟาจถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และเติมบัฟเฟอร์ MES (ความแข็งแรงไอออน หรือ IS เท่ากับ 0.04 0.14 หรือ 0.24 ขึ้นอยู่กับลำดับการทดลอง) ก่อนการทำการทดสอบด้วยพลาควิด



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างผงฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีรีโอฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope; AFM)

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) เป็นหนึ่งในเครื่องมือประสิทธิภาพในการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยความละเอียดสูงสุดประมาณ 1 nm ถูกนำมาใช้ในการศึกษาตัวอย่างทางชีววิทยาอย่างแพร่หลาย หลักการทำงานของเครื่องมือเพื่อสร้างภาพผ่านการสแกนพื้นที่ของตัวอย่างด้วยเข็มขนาดเล็ก (Tip) ที่ติดอยู่กับคาน (Cantilever) ซึ่งอาศัยแรงดึงดูด (Attractive force) และแรงผลัก (Repulsive force) ระหว่างเข็มและตัวอย่าง ทำให้เกิดการโค้งงอของคาน และเกิดการสะท้อนของลำแสงเลเซอร์ (Laser beam) ที่สะท้อนบนคานระหว่างการสแกนพื้นที่ผิวของตัวอย่างเข้าสู่โฟโตไดโอด (Photodiode) และมีการแปลงสัญญาณเป็นภาพ โดยวิธีการ Non-contact mode ที่ใช้ในงานนี้เป็นวิธีที่เข็มขนาดเล็กอยู่ห่างจากวัสดุมากกว่า Contact mode เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายตัวอย่างชีววิทยา [94]–[97]

3.9.1 การเตรียมตัวอย่างฟาจก่อนการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

1. ลอกแผ่นไมกา
2. แช่แผ่นไมกาในสารละลาย 1%(v/v) ของ APTS ในน้ำปราศจากไอออนและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารความเร็วรอบ 50 rpm เป็นระยะเวลา 15 นาที
3. ล้างแผ่นไมกาด้วยน้ำปราศจากไอออนและทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน
4. หยดสารละลายแบคทีรีโอฟาจ C22 ปริมาตร 50 μl ที่มีความเข้มข้นฟาจประมาณ 10^{12} – 10^{13} PFU/ml และทิ้งไว้บนแผ่นไมกาที่ผ่านการแช่ทิ้งไว้ในสารละลาย APTS เป็นระยะเวลา 30 นาที
5. ล้างแผ่นไมกาอีกครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออนและทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ก่อนการนำไปส่องภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

3.9.2 การส่องภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM imaging)

การเก็บรูปภาพฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) มีการใช้โหมด Non-contact mode (AC mode) ด้วยเครื่อง NanoWizard 3 BioScience AFM (JKP BioAFM–Bruker) และเข็มขนาดเล็ก (Cantilever with small tip) รุ่น ACTA model จาก AppNano ด้วยค่าคงที่ของสปริงประมาณ 30–40 N/m ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของปลายเข็มประมาณ 6 nm โดยมีการนำวิธีการ Thermal tuning เข้ามาช่วยในการเก็บภาพโครงสร้างของฟาจ C22 โดยภาพที่ได้จะมีทั้งทิศทางแนวนอนในระนาบ แนวตั้งในระนาบ และแนวตั้งฉากกับระนาบ โดยกำหนดเป็นแนวแกน x y และ z ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3 การนับจำนวนอนุภาคฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

ลักษณะทางสัญญาณวิทยาของอนุภาคฟาจที่ได้จากการส่องภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฟาจและน้ำตาล โดยฟาจที่นำไปส่องภาพมีทั้งหมด 4 สภาวะ พื้นที่ในการสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ประมาณ $210 \mu\text{m}^2$ ได้แก่

1. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES
2. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
3. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M
4. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M

และมีการแบ่งเกณฑ์ระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่

- ระดับที่ 1 คือ อนุภาคฟาจ C22 กระจายตัวแบบเดี่ยว
- ระดับที่ 2 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 2-4 อนุภาค
- ระดับที่ 3 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 5-10 อนุภาค
- ระดับที่ 4 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 11-20 อนุภาค
- ระดับที่ 5 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกันมากกว่า 20 อนุภาค

หลังจากนั้นจะมีการเก็บบันทึกข้อมูลระดับการเกาะกลุ่มกันของฟาจ C22 ทั้งที่มีการกระจายตัวแบบเดี่ยวและรวมกลุ่มกัน ข้อมูลระดับการเกาะกลุ่มกันของฟาจ C22 จะถูกเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในตัวอย่างแต่ละกลุ่มด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ (Tukey-Kramer)

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลตามหลักการทางสถิติด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ (Tukey-Kramer)

หลักการวิธีการทูคี-เครเมอร์ถูกใช้เพื่อหาความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ในที่นี้วิธีการทูคี-เครเมอร์ทดสอบใน MATLAB (R2021a version) ด้วยช่วงความเชื่อมั่น 95% โดยมีการทดสอบกับ 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1. การทดสอบฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (IS = 0.14 M) ผสมกับสารคงประสิทธิภาพ 6 ชนิด ทดสอบทั้งหมด 7 สภาวะก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งสำหรับระยะเวลาการจัดเก็บ 45 วันในรูปแบบสารละลาย ได้แก่

1. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ
2. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.5 M
3. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับกาแลคโตสที่ความเข้มข้น 0.5 M
4. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
5. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M
6. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแลคโตสที่ความเข้มข้น 0.5 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M

กลุ่มที่ 2. การทดสอบฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (IS = 0.14 M) ผสมกับสารคงประสิทธิภาพ 3 ชนิด ทดสอบทั้งหมด 10 สภาวะภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งสำหรับระยะเวลาการจัดเก็บ 90 วันในฟาจรูปแบบแห้ง ได้แก่

1. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ
2. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 M
3. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 M
4. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
5. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.1 M
6. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.25 M
7. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M
8. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 M
9. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.25 M
10. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M

กลุ่มที่ 3. การวิเคราะห์ข้อมูลจากร้อยละความถี่สัมพัทธ์ของระดับการรวมกลุ่มของอนุภาคฟาจ C22 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ผ่าน 4 สภาวะในการทดลอง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ความเข้มข้นไอออนเท่ากับ 0.14 (IS = 0.14 M) ได้แก่

1. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES
2. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
3. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M
4. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M

3.11 การออกแบบการทดลองและหาสภาวะสำหรับการทำแห้งฟาจแบบแช่แข็งที่เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาสภาวะสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ที่เหมาะสมและสามารถจำลองโมเดลสมการกำลังสองได้จากสมการที่ 3.3 [85] ผ่านโปรแกรม Minitab 19 ในงานวิจัยมีการศึกษาปัจจัยที่น่าจะมีนัยสำคัญเพิ่มเติมสำหรับการค้นหาสูตรการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ที่มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นฟาจได้ดี

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3.3)$$

โดย y คือ ค่าการตอบสนองต่อปัจจัย x_i และ x_j คือ ชนิดของปัจจัย โดย i และ j คือ จำนวนตัวอย่างที่สุดคล้องกับปัจจัยนั้น β_0 คือ Intercept term β_i คือ Linear term β_{ii} คือ Square term β_{ij} คือ Interaction term และ ε คือ ค่าความคลาดเคลื่อน

จากบทที่ 4 พบว่าน้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นสารคงประสิทธิภาพสำหรับการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ได้ดีระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง จึงมีการนำน้ำตาลทั้ง 2 ตัวมาศึกษาต่อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ผ่านวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาปัจจัยอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์และปริมาตรของฟาจ ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยเฉพาะความแข็งแรงไอออน มีการศึกษาการปรับเปลี่ยนค่าความแข็งแรงไอออนผ่านบัฟเฟอร์ MES ในที่นี้จึงมีการศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่

1. ความเข้มข้นของซูโครส (Sucrose concentration) หน่วยโมลาร์ (M)
2. ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (Trehalose concentration) หน่วยโมลาร์ (M)
3. ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (Ionic strength of buffer) หน่วยโมลาร์ (M)
4. ปริมาตรของฟาจ (Phage volume) หน่วยไมโครลิตร (μl)

ปัจจัยตอบสนองในการศึกษานี้ คือความเข้มข้นฟาจคงเหลือ โดยปัจจัยและช่วงของปัจจัยที่กำหนดในการทดลองทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3.1 และการออกแบบการทดลองผ่านวิธีการออกแบบการทดลองด้วยบ็อกซ์-เบห์นเคน มีการทดลองทั้งหมด 27 ลำดับแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยและช่วงของปัจจัยที่กำหนดในการทดลอง

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ช่วงและระดับการทดลอง		
		-1	0	1
ความเข้มข้นของซูโครส (M)	A	0	0.25	0.5
ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (M)	B	0	0.25	0.5
ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (M)	C	0.04	0.14	0.24
ปริมาตรของฟาจ (μl)	D	100	200	300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับปัจจัย 4 ปัจจัยและปัจจัยตอบสนอง 1 ปัจจัย

ลำดับการทดลอง	ตัวแปร (Coded variables)			
	A	B	C	D
1	-1	-1	0	0
2	1	-1	0	0
3	-1	1	0	0
4	1	1	0	0
5	0	0	-1	-1
6	0	0	1	-1
7	0	0	-1	1
8	0	0	1	1
9	-1	0	0	-1
10	1	0	0	-1
11	-1	0	0	1
12	1	0	0	1
13	0	-1	-1	0
14	0	1	-1	0
15	0	-1	1	0
16	0	1	1	0
17	-1	0	-1	0
18	1	0	-1	0
19	-1	0	1	0
20	1	0	1	0
21	0	-1	0	-1
22	0	1	0	-1
23	0	-1	0	1
24	0	1	0	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับปัจจัย 4 ปัจจัยและปัจจัยตอบสนอง 1 ปัจจัย (ต่อ)

ลำดับการทดลอง	ตัวแปร (Coded variables)			
	A	B	C	D
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

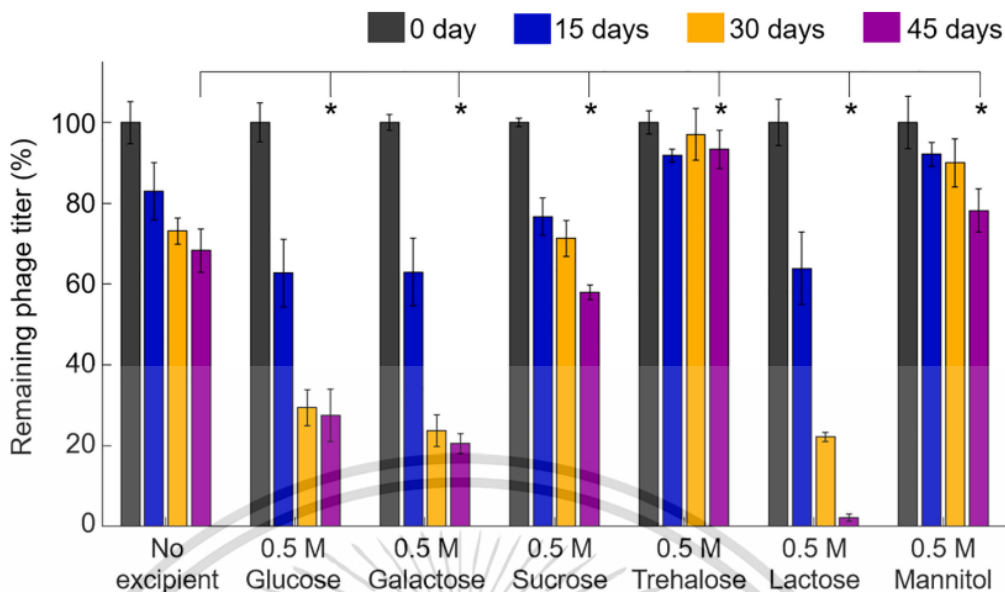
บทที่ 4

ผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ทดสอบสารคงประสิทธิภาพ 3 กลุ่ม แบ่งได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส และกาแลคโตส น้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส และแลคโตส สุดท้ายน้ำตาล แอลกอฮอล์ คือ เมานิทอล การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นของฟาจ C22 ก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เริ่มจากการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (ฟาจรูปแบบสารละลาย) หลังจากนั้นจะมีการคัดเลือกสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อการจัดเก็บรักษาฟาจ C22 และทดสอบหาความเข้มข้นฟาจหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (ฟาจรูปแบบแห้ง) ตามด้วยการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงลึกระหว่างฟาจกับสารคงประสิทธิภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ สุดท้ายจะมีการประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการจัดเก็บรักษาฟาจ C22

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพสำหรับการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในรูปแบบสารละลาย

การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพสำหรับการคงสภาพฟาจ C22 ในรูปแบบสารละลายที่ความเข้มข้น 0.5 M แสดงในรูปที่ 4.1 โดยมีการใช้สารคงประสิทธิภาพทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และเมานิทอล รวมเป็นการทดสอบทั้งหมด 7 สภาวะ ได้แก่ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับกลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และเมานิทอล ตัวอย่างฟาจ C22 ถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C มีการทดสอบหาร้อยละความเข้มข้นฟาจคงเหลือสัมพัทธ์ด้วยวิธีการทดสอบด้วยพลาควา (Plaque assay) ทุกๆ 15 วันเป็นระยะเวลาทั้งหมด 45 วัน ผลลัพธ์จากวิธีการทดสอบด้วยพลาควาถูกแสดงเป็นร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ น้ำตาลที่มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ได้ดีจะถูกคัดเลือกสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งและนำไปทดสอบต่อในขั้นตอน 4.2 ซึ่งเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพสำหรับการคงสภาพฟาจ C22 ในรูปแบบแห้งที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 M



รูปที่ 4.1 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ แต่ละสภาวะก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 45 วัน แถบข้อผิดพลาด (Error bar) แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

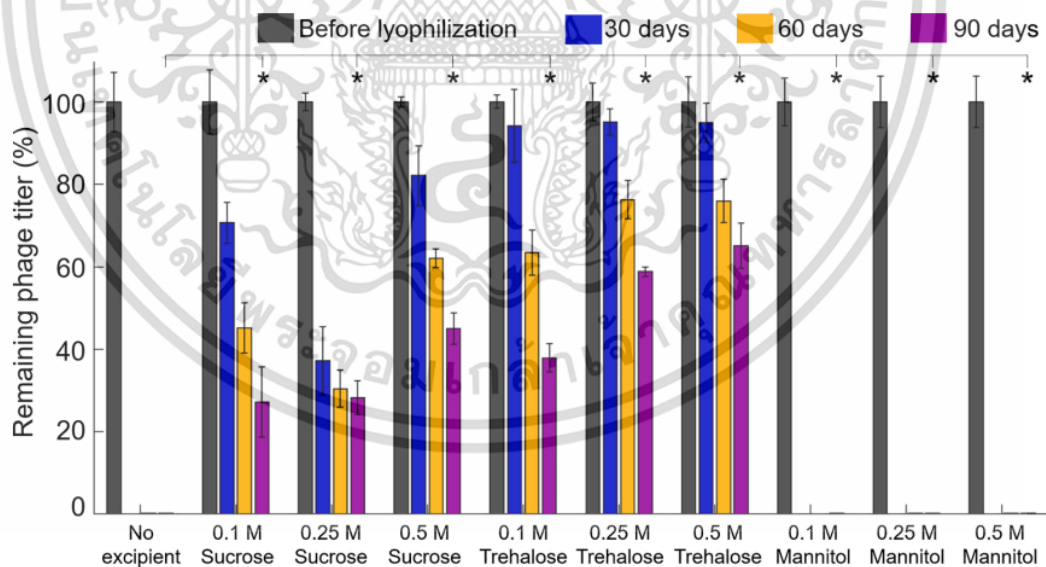
ภายหลังการจัดเก็บฟาจ 15 วัน พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับกลูโคส กาแลคโตส และแลคโตสประมาณ 60% ขณะที่ฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และผสมกับซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลพบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 80-90%

ภายหลังการจัดเก็บฟาจ 30 วัน พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับกลูโคส กาแลคโตส และแลคโตสคงเหลือประมาณ 20-30% ขณะที่ฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และผสมกับซูโครสพบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 70-80% สุกท้ายฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสและแมนนิทอลพบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 90-95%

ภายหลังการจัดเก็บฟาจ 45 วัน พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแลคโตสคงเหลือประมาณ 2% กลูโคสและกาแลคโตสคงเหลือประมาณ 20-30% ซูโครสคงเหลือประมาณ 60% ขณะที่ฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพและผสมกับแมนนิทอลพบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 70-80% สุกท้ายทรีฮาโลส พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือมากกว่า 90% โดยข้อมูลของร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งถูกแสดงในภาคผนวก ข. ตาราง ข.1

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพที่ถูกคัดเลือกสำหรับการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

จากหัวข้อ 4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพในสำหรับการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในรูปแบบสารละลาย พบว่าน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจได้ดีภายในระยะเวลาการจัดเก็บ 45 วัน ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M จึงมีการศึกษาประสิทธิภาพในการคงสภาพฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งของสารคงประสิทธิภาพทั้ง 3 ชนิด และมีการศึกษาสถานะเพิ่มเติมที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 M ทดสอบระยะเวลาการจัดเก็บนานขึ้นเป็น 90 วัน ดังนั้นจึงมีการทดสอบทั้งหมด 10 สถานะ ได้แก่ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 M โดยมีการทดสอบหาร้อยละความเข้มข้นฟาจคงเหลือสัมพัทธ์ผ่านวิธีการทดสอบด้วยพลาคาทุกๆ 30 วัน ผลลัพธ์ที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่แข็ง คือผงฟาจ หรือฟาจรูปแบบแห้ง ดังนั้นก่อนการทำการทดสอบด้วยพลาคาจำเป็นจะต้องมีการคืนความชุ่มชื้นแก่ฟาจด้วยการผสมผงฟาจกับน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ตัวอย่างฟาจรูปแบบสารละลาย โดยร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในแต่ละสถานะแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์แต่ละสถานะเทียบระหว่างก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 30 วันเป็นระยะเวลา 90 วัน แถบข้อผิดพลาด (Error bar) แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายหลังการจัดเก็บฟาจ 30 วัน พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และผสมกับแมนนิทอลสำหรับทุกความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1% ขณะที่ความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส และทรีฮาโลส พบว่ามีความเข้มข้นฟาจคงเหลือมากกว่า 40%

ภายหลังการจัดเก็บฟาจ 60 วัน พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และผสมกับแมนนิทอลสำหรับทุกความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1% ผลที่ได้สอดคล้องกับระยะเวลาการจัดเก็บฟาจ 30 วัน ขณะที่ความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส และทรีฮาโลสสำหรับทุกความเข้มข้นมีการลดลงของความเข้มข้นฟาจคงเหลือเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการจัดเก็บฟาจ 30 วัน พบว่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือมากกว่า 30%

ภายหลังการจัดเก็บฟาจ 90 วัน พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และผสมกับแมนนิทอลสำหรับทุกความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1% ผลที่ได้สอดคล้องกับระยะเวลาการจัดเก็บฟาจ 30 และ 60 วัน สำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 M พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 20-30% ซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M พบว่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 45% และฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.1 M พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 40% ทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.25 M พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 60% สุดท้ายทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือประมาณ 65% โดยข้อมูลของร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพันธ์เทียบระหว่างก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งถูกแสดงในตารางในภาคผนวก ข. ตาราง ข.3

สรุปผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ซึ่งอยู่ในรูปแบบสารละลาย สารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีและมีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือ ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M ขณะที่น้ำตาลที่ส่งผลเสียและมีประสิทธิภาพต่ำในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือ ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และแลคโตสที่ความเข้มข้น 0.5 M และผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ซึ่งอยู่ในรูปแบบแห้ง พบว่าน้ำตาลที่ส่งผลดีและมีประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ C22 ได้แก่ ซูโครส และทรีฮาโลส โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 0.5 M และทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 M ขณะที่แมนนิทอลที่ทุกความเข้มข้นมีความสามารถในการรักษาการติดเชื้อของฟาจ C22 ได้ต่ำ

ผลการทดสอบมีความสอดคล้องกับในหลายๆ งานวิจัยที่ชี้ว่าส่วนใหญ่ น้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการคงสภาพฟาจ เมื่อเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [17], [21]-[22], [76], [78], [80] โดยเฉพาะซูโครสและทรีฮาโลสถือเป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพสำหรับการนำมาใช้ในการสร้างสูตรสำหรับการจัดเก็บรักษาและการทำแห้งโปรตีนและฟาจได้ดี [17], [22], [76], [79]-[80]

นอกจากนี้ซูโครสและทรีฮาโลสถือว่าเป็นน้ำตาลที่ทำหน้าที่ในการปกป้องฟาจ C22 จากการสูญเสียเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพธรรมชาติและการเสื่อมสภาพได้ดี เนื่องจากซูโครสและทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งมีคุณสมบัติ

1. น้ำตาลโมเลกุลคู่ มีความยืดหยุ่นทางโครงสร้างมากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลคู่มีความสามารถในการรองรับโครงสร้างของฟาจได้ดีเมื่อเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [17], [22], [39]
2. น้ำตาลโมเลกุลคู่ มีอุณหภูมิสภาพแก้ว (Glass transition temperature) สูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อย่างเช่น กลูโคส และกาแลคโตส (ค่าอุณหภูมิสภาพแก้วแสดงในตาราง ก.8) ทำให้ตัวอย่างฟาจสามารถคงสถานะคล้ายแก้ว (Solid-like Glassy State) ไว้ได้ดี ช่วยจำกัดการเคลื่อนที่และเพิ่มความเสถียรของอนุภาคฟาจ [18]-[19], [39], [98]

นอกจากนี้ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ทรีฮาโลสสามารถแทนที่น้ำและทำอันตรกิริยากับแคปซิดที่หุ้มภายนอกฟาจ เพื่อรักษาโครงสร้างของฟาจระหว่างการระเหิดของน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ [39] ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาทำให้การใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ (ซูโครสและทรีฮาโลส) เป็นสารคงประสิทธิภาพ ช่วยเพิ่มความเสถียรของฟาจ C22 ป้องกันฟาจ C22 จากการสูญเสียสภาพธรรมชาติ และการเสื่อมสภาพจากความเครียดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคสและกาแลคโตส) เป็นสารคงประสิทธิภาพที่มีความยืดหยุ่นของโครงสร้างและอุณหภูมิสภาพแก้วน้อยกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ (ซูโครสและทรีฮาโลส) ทำให้ความสามารถในการรองรับโครงสร้างฟาจ C22 ไม่มีประสิทธิภาพ และอาจนำไปสู่การก่อความเสียหายต่อโครงสร้างฟาจ C22 [17], [19], [22], [98]

ขณะที่แลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่เหมือนซูโครสและทรีฮาโลส แต่ผลการทดสอบความสามารถในการรักษาประสิทธิภาพของฟาจ C22 ต่างจากผลการทดสอบของซูโครสและทรีฮาโลส ถึงแม้ว่าอุณหภูมิสภาพแก้วของแลคโตสใกล้เคียงกับทรีฮาโลส (ค่าอุณหภูมิสภาพแก้วแสดงในตาราง ก.8) โดยผลการทดสอบของแลคโตส พบว่าแลคโตสเป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ได้ต่ำและไม่เหมาะสำหรับการนำมาทำสูตรสำหรับการจัดเก็บรักษาฟาจ C22 สาเหตุอาจเนื่องมาจาก 2 ปัจจัย ได้แก่

1. แลคโตส เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) สามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีผ่าน Maillard reaction ทำให้หมู่ฟังก์ชันของน้ำตาลเกิดอันตรกิริยากับโปรตีน ส่งผลต่อการสูญเสียหมู่ฟังก์ชันและการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณสมบัติของโปรตีน จึงทำให้แลคโตสไม่สามารถรองรับโครงสร้างของโปรตีนและฟาจ C22 ได้อย่างมีประสิทธิภาพและนำไปสู่ความเสียหายของโครงสร้างฟาจ C22 ต่างจากซูโครสและทรีฮาโลส [81], [99]-[100]
2. แลคโตส มีแนวโน้มที่จะเกิดการ Recrystallization ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำของแลคโตสต่ำ (ความสามารถในการละลายแสดงในตาราง ก.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่แลคโตสยังไม่พบหลักฐานอย่างแน่ชัดว่าส่งผลเสียต่อฟาจ [39] นอกจากนี้ยังมีบางงานวิจัยที่พบว่าแลคโตสมีความสามารถในการรักษาความเสถียรและความเข้มข้นฟาจได้ดี [82]-[83]

แมนนิทอล อย่างที่กล่าวไว้ข้างต้นว่ามีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นฟาจได้ดีในช่วงก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (ฟาจในรูปแบบสารละลาย) ขณะที่ภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง (ฟาจในรูปแบบแห้ง) พบว่าแมนนิทอลไม่สามารถคงสภาพธรรมชาติของฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งทำให้เมื่อนำฟาจ C22 ผสมกับน้ำปราศจากไอออน ภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ฟาจ C22 ไม่สามารถคืนสภาพธรรมชาติในการเข้าไปติดเชื้อ จึงส่งผลต่อการสูญเสียความเข้มข้นฟาจ C22 โดยตรง ความแตกต่างทางด้านประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ในช่วงก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งของแมนนิทอล น่าจะมีสาเหตุมาจาก

1. แมนนิทอล มีแนวโน้มที่จะเกิดการ Recrystallization ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง น่าจะเกิดจากความสามารถในการละลายน้ำของแมนนิทอลต่ำ (ความสามารถในการละลายแสดงในตาราง ก.8) [22], [58], [101]
2. แมนนิทอล ก่อโครงสร้างผลึกระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ขณะที่ซูโครสและทรีฮาโลสก่อโครงสร้างอสัณฐานเพื่อรองรับโครงสร้างของฟาจ C22 ซึ่งส่งผลดีต่อฟาจมากกว่าโครงสร้างผลึกที่มีความยืดหยุ่นของโครงสร้างน้อยกว่า [57], [99]

การศึกษาของ Zhang และคณะ ที่มีการนำเทคนิควิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction; XRD) เพื่อสำรวจโครงสร้างของตัวอย่างฟาจ M13 โดยมีการศึกษาสารคงประสิทธิภาพทั้งแมนนิทอล ซูโครส และทรีฮาโลส พบว่าตัวอย่างฟาจ M13 ที่ใช้แมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพมีโครงสร้างผลึกแตกต่างจากตัวอย่างฟาจ M13 ที่ใช้ซูโครสและทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพ มีโครงสร้างอสัณฐาน การศึกษาสารคงประสิทธิภาพเพิ่มเติม โดยการใช้แมนนิทอลร่วมกับทรีฮาโลสพบว่าทรีฮาโลสสามารถยับยั้งการก่อตัวของโครงสร้างผลึกที่เกิดขึ้นภายในตัวอย่างฟาจ M13 ได้ดี ความสามารถในการยับยั้งการก่อตัวของโครงสร้างผลึกเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของทรีฮาโลสที่เพิ่มขึ้น ขณะที่การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของแมนนิทอลเพิ่มความเป็นผลึกของโครงสร้าง ผลลัพธ์การใช้แมนนิทอล ซูโครส และทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพ (วิเคราะห์การหาความเข้มข้นฟาจ M13 ผ่านวิธีการทดสอบด้วยหลอด) พบว่าการใช้แมนนิทอลไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ M13 เมื่อเทียบกับผลลัพธ์ที่ได้จากซูโครสและทรีฮาโลส นอกจากนี้ผลลัพธ์การใช้แมนนิทอลร่วมกับทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพ (วิเคราะห์การหาความเข้มข้นฟาจ M13 ผ่านวิธีการทดสอบด้วยหลอด) พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของทรีฮาโลสในส่วนผสมของทรีฮาโลสและแมนนิทอลช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของฟาจ M13 ตามอัตราส่วนของทรีฮาโลสที่เพิ่มขึ้น ขณะที่การเพิ่มอัตราส่วนของแมนนิทอลทำให้ความเข้มข้นฟาจ M13 ลดลง [57] จากการเปรียบเทียบผลการศึกษาจากเทคนิควิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) และวิธีการทดสอบด้วยหลอด จึงอาจกล่าวได้

ว่า โครงสร้างผลึกทำลายโครงสร้างของฟาจ M13 เมื่อเทียบกับโครงสร้างอสัณฐาน [57], [84]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากโครงสร้างผลึกมีความยืดหยุ่นทางโครงสร้างน้อยกว่าโครงสร้างอสัณฐาน ทำให้การก่อตัวของโครงสร้างผลึกเกิดการทำลายโครงสร้างฟาจ นำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ M13

ผลการศึกษาของตัวอย่างฟาจ C22 ที่ใช้แมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่กล่าวว่า แมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพที่มีความสามารถในการรักษาสภาพฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งได้ต่ำ [17], [22], [76] ทั้งนี้งานวิจัยส่วนใหญ่ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของแมนนิทอลในการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ โดยการนำแมนนิทอลผสมกับน้ำตาลหรือสารคงประสิทธิภาพตัวอื่น โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลคู่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาความสามารถในการติดเชื้อของฟาจ [39]

การจัดเก็บฟาจ C22 ในรูปแบบแห้งสามารถรักษาความเสถียร และความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อยาวนานกว่าฟาจ C22 ที่ถูกจัดเก็บในรูปแบบสารละลาย โดยระยะเวลาจัดเก็บที่ยาวนานขึ้น ส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากอิทธิพลของการทำแห้งแบบแช่แข็ง เนื่องจากการทำแห้งแบบแช่แข็งช่วยจำกัดการเคลื่อนที่ของอนุภาคฟาจ ทำให้ฟาจสามารถคงสภาพตัวเองได้นานกว่าเมื่อถูกจัดเก็บในรูปแบบแห้ง ซึ่งมีความสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่าการจัดเก็บโปรตีนในรูปแบบแห้งมีความเสถียรมากกว่าการจัดเก็บโปรตีนในรูปแบบสารละลาย [18], [39] เนื่องจากโปรตีนในรูปแบบสารละลายมีความไวต่อการสูญเสียสภาพภายใต้สภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ pH นอกจากนี้การจัดเก็บในรูปแบบแห้งยังสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาเคมี เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และดีแอมิเนชัน (Deamidation) ซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียสภาพโปรตีน [18], [57] ถึงแม้ว่าการทำแห้งแบบแช่แข็งสามารถยืดระยะเวลาการจัดเก็บฟาจได้ดี แต่ยังคงมีความจำเป็นในการใช้สารคงประสิทธิภาพ เพื่อช่วยฟาจและโปรตีนผ่านความเครียดที่เกิดจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โครงสร้างของฟาจส่วนใหญ่ ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกและโปรตีน จึงสามารถนำการศึกษาที่เคยศึกษาในโปรตีนเข้ามาช่วยในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างฟาจกับสารคงประสิทธิภาพ โดยผลการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารคงประสิทธิภาพในฟาจและโปรตีนอาจมีความความต่างบ้างเล็กน้อย เนื่องจากความแตกต่างกันของโครงสร้างของฟาจและโปรตีน

4.3 การวิเคราะห์อิทธิพลของสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลต่อระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

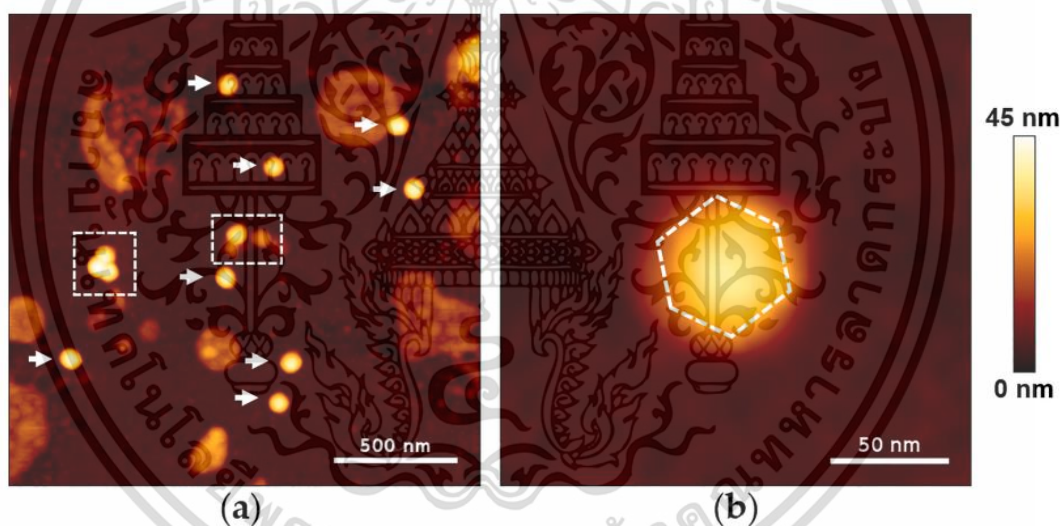
จากการทดสอบหัวข้อ 4.2 พบว่าภายหลังจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ซูโครสและทรีฮาโลสส่งผลดีต่อฟาจ C22 โดยเฉพาะทรีฮาโลสที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 และ 0.5 M ขณะที่แมนนิทอล พบความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือน้อยมาก จึงมีการนำกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) เข้ามาใช้ในการศึกษาโครงสร้างและการรวมกลุ่มกันของฟาจเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสารคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

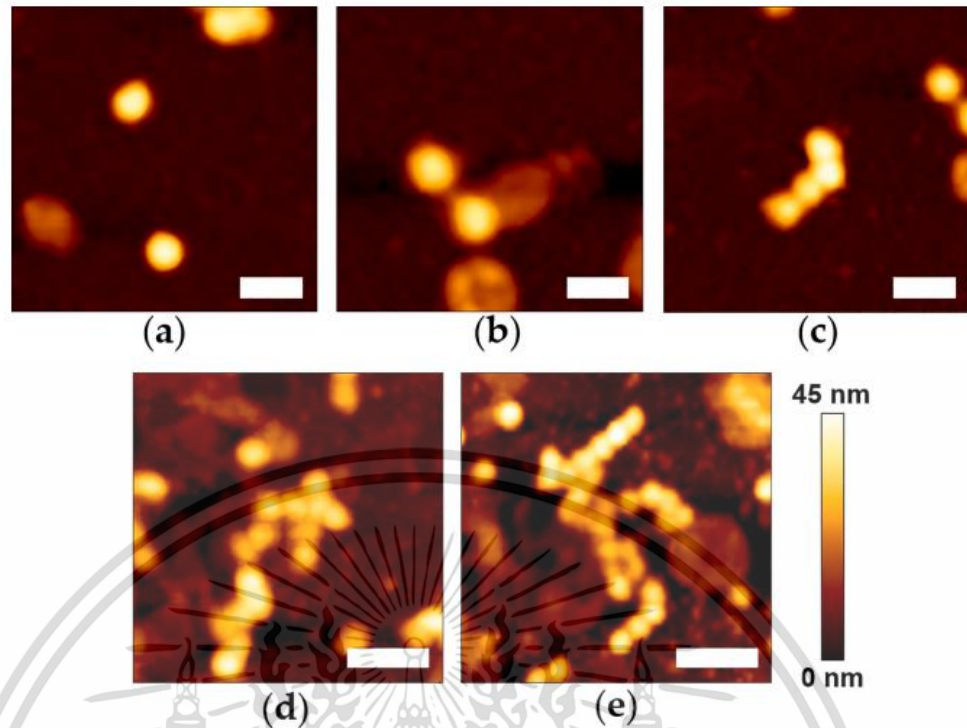
ประสิทธิภาพ (ซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอล) และฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยก่อนการส่องภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) จะมีการเติมน้ำปราศจากไอออนในผงฟาจเพื่อสร้างฟาจรูปแบบสารละลายเหมือนวิธีการทดสอบด้วยฟลาคและใช้สาร APTS ในการเคลือบแผ่นไมกา สามารถแบ่งสภาวะที่ศึกษาได้เป็น 4 สภาวะ ได้แก่

1. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES
2. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
3. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M
4. ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M

จากรูปที่ 4.3 สามารถสังเกตพฤติกรรมการกระจายตัวและรูปร่างของอนุภาคฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ทั้งอนุภาคฟาจ C22 กระจายตัวแบบเดี่ยว และรวมกลุ่มกันประมาณ 2-3 อนุภาค (รูปที่ 4.3a) และรูปร่างของฟาจ C22 แบบ Icosahedral (4.3b)



รูปที่ 4.3 ภาพอนุภาคฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม
 (a) อนุภาคฟาจ C22 การกระจายตัวแบบเดี่ยว (ลูกศรสีขาว) และอนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกันประมาณ 2-3 อนุภาค (กล่องสี่เหลี่ยมเส้นประสีขาว) โดย Scale bar เท่ากับ 500 nm
 (b) รูปร่างของอนุภาคฟาจ C22 (เส้นประหกเหลี่ยมสีขาว) โดย Scale bar เท่ากับ 50 nm และ Color scale bar แสดงความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ (แถบด้านขวา)



รูปที่ 4.4 ภาพกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ทั้งการกระจายตัวแบบเดี่ยวและรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดยมี Color scale bar แสดงความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ (แถบด้านขวา) (a) อนุภาคฟาจ C22 กระจายตัวแบบเดี่ยวในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (b) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 2 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (c) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 4 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (d) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 15 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M (e) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 28 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M โดยรูป (a) (b) และ (c) มี Scale bar เท่ากับ 100 nm และรูป (d) และ (e) มี Scale bar เท่ากับ 200 nm

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ในรูปที่ 4.4 แสดงตัวอย่างพฤติกรรมของการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ทั้งการกระจายตัวแบบเดี่ยวและรวมกลุ่มกันทั้งหมด 5 รูป โดยสามารถสังเกตเห็นการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ต่างกันตามสภาวะที่ทดสอบ ดังนี้

รูปที่ 4.4a) แสดงอนุภาคฟาจ C22 กระจายตัวแบบเดี่ยวในสารละลายบัฟเฟอร์ MES

รูปที่ 4.4b) แสดงอนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 2 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES

รูปที่ 4.4c) แสดงอนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 4 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES

รูปที่ 4.4d) แสดงอนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 15 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M

รูปที่ 4.4e) อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 28 อนุภาคในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับ ซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M

จากการสังเกตพฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ในรูปที่ 4.4 สามารถแบ่งเกณฑ์ระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจเป็น 5 ระดับตามความเหมาะสม ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ อนุภาคฟาจ C22 กระจายตัวแบบเดี่ยว

ระดับที่ 2 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 2-4 อนุภาค

ระดับที่ 3 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 5-10 อนุภาค

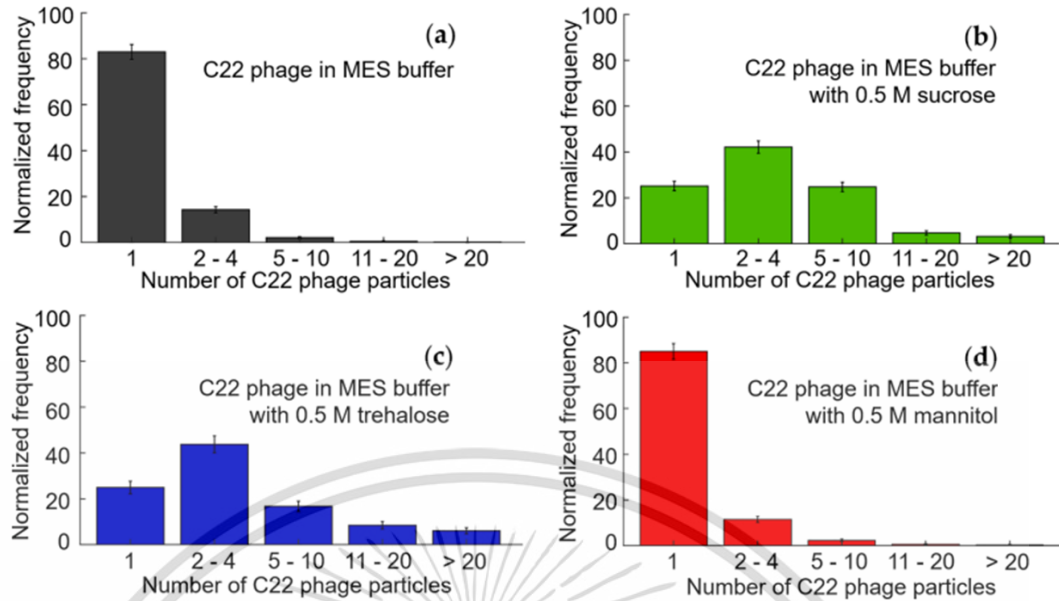
ระดับที่ 4 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกัน 11-20 อนุภาค

ระดับที่ 5 คือ อนุภาคฟาจ C22 รวมกลุ่มกันมากกว่า 20 อนุภาค

โดยระดับที่ 1 จัดอยู่ในระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 เกณฑ์ต่ำ ระดับที่ 2 และ 3 จัดอยู่ในระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 เกณฑ์ปานกลาง สูดท้ายระดับที่ 4 และ 5 จัดอยู่ในระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 เกณฑ์สูง ดังนั้นระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ในรูปที่ 4.4a) จัดอยู่ในระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 เกณฑ์ต่ำ รูปที่ 4.4b) และรูปที่ 4.4c) จัดอยู่ในระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 เกณฑ์ปานกลาง รูปที่ 4.4d) และรูปที่ 4.4e) จัดอยู่ในระดับการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 เกณฑ์สูง

รูปที่ 4.5 แสดงร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ของ 4 สภาวะ ได้แก่ ฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ ฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M (ข้อมูลตัวเลขแสดงในตาราง ข.5) จากการเก็บข้อมูลระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 พบว่าฟาจในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ และผสมกับแมนนิทอลไม่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ มีระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ต่ำประมาณ 80% เกณฑ์ปานกลางประมาณ 13-17% และเกณฑ์สูงประมาณ 1% ดังนั้นระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ต่ำเหมือนกัน

ขณะที่ซูโครสและทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลที่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ดังแสดงในรูปที่ 4.5b) และ 4.5c) ซึ่งแสดงร้อยละความถี่สัมพัทธ์ของอนุภาคฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส และทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M ตามลำดับ ทั้ง 2 สภาวะ มีระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ต่ำประมาณ 25% เกณฑ์ปานกลางประมาณ 60-67% และเกณฑ์สูงประมาณ 7-15% จึงกล่าวได้ว่าซูโครสและทรีฮาโลสมีระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ปานกลางเหมือนกัน ดังนั้นระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ของแมนนิทอลต่างจากซูโครสและทรีฮาโลสอย่างชัดเจน



รูปที่ 4.5 ร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ทั้งการกระจายตัวแบบเดี่ยว และรวมกลุ่มกันสำหรับการทดสอบ 4 สภาวะภายหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ได้แก่ (a) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES (b) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.5 M (c) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M (d) ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M แถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) บ่งบอกถึงการเกิดความคลาดเคลื่อนจากการนับ

จากผลการศึกษา จึงนำไปสู่การนำเสนอทฤษฎีการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเพื่ออธิบายพฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ในแต่ละสภาวะการทดลอง ดังนี้ กลไกการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ช่วยปกป้อง และรักษาสภาพธรรมชาติของฟาจ C22 ผ่านการลดพื้นที่ผิวรอบนอก จำกัดการเคลื่อนที่ และลดโอกาสในการชนกันของอนุภาคฟาจ C22 ดังนั้นกลไกการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง สามารถรักษาการรอดชีวิตของฟาจ C22 จากปัจจัยและสภาพแวดล้อมรุนแรง ที่เป็นอันตรายต่อการรอดชีวิตของฟาจ (เช่น การเปลี่ยนแปลงค่าของ pH ความชื้น อุณหภูมิ) เอื้อให้ฟาจสามารถรักษาโครงสร้าง และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเชื้อได้ดี ส่งผลให้สามารถยืดอายุการจัดเก็บรักษาฟาจในระยะยาว ยกตัวอย่างกรณีของซูโครสและทรีฮาโลส พบว่าเป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ได้ดี (รูปที่ 4.2) และส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 (รูปที่ 4.5) สัมพันธ์กับผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ในรูปที่ ค.3 และ ค.4 แสดงภาพอนุภาคฟาจ C22 เมื่อใช้ซูโครสและทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพ พบว่าโครงสร้างของฟาจ C22 ไม่ถูกทำลาย ส่งผลให้ฟาจยังสามารถรักษาสภาพธรรมชาติได้ดีเมื่อใช้ซูโครสและทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพ ขณะที่พฤติกรรมกระจายตัวของอนุภาคฟาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Disaggregation) ส่งผลเสียต่อการรักษาสภาพธรรมชาติของฟาจ C22 ยกตัวอย่างกรณีของแมนนิทอล พบว่าเป็นสารคงประสิทธิภาพที่ไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 (รูปที่ 4.2) และไม่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 (รูปที่ 4.5) สัมพันธ์กับผลการศึกษามากจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ในรูปที่ ค.5 พบว่าการใช้แมนนิทอลไม่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างของฟาจ C22 ถูกทำลายเป็นจำนวนมากในรูปที่ ค.6 สาเหตุที่โครงสร้างฟาจถูกทำลายระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เมื่อเทียบกับซูโครสและทรีฮาโลส น่าจะเกิดจากแมนนิทอลมีแนวโน้มสูงในการเกิด Recrystallization เนื่องจากความสามารถในการละลายของแมนนิทอลอยู่ในเกณฑ์ต่ำ นำไปสู่การสูญเสียสภาพธรรมชาติและโครงสร้างของฟาจ C22 ถูกทำลาย [58], [101] ทำให้เมื่อมีการคืนความชุ่มชื้นแก่ฟาจด้วยน้ำปราศจากไอออนภายหลังการทำแห้งแบบแช่แข็ง ฟาจไม่สามารถคืนสภาพธรรมชาติ และสูญเสียความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อ ดังนั้นแมนนิทอลเป็นสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลเสียต่อฟาจ C22 ขณะที่ซูโครส และทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อฟาจ C22

ข้อสรุปของพฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ฟาจมีโอกาสรอดชีวิตมากขึ้น โดยผลการศึกษาของฟาจ C22 สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาโดย Szermer-Olearnik และคณะ มีการศึกษาฟาจ T4 ในสภาพแวดล้อมที่มีไอออนผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscope; AFM) พบว่าการรวมกลุ่มกันของฟาจ T4 เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยคงสภาพ และรักษาความเสถียรของฟาจ T4 [102] ขณะที่หลายงานวิจัยที่ทำการศึกษเกี่ยวกับฟาจและโปรตีนชนิดอื่น พบว่าผลลัพธ์ที่เกิดจากพฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจและโปรตีนของงานวิจัยเหล่านั้นต่างจากผลลัพธ์ที่เกิดจากพฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 และ T4 โดยมีการนำเสนอว่า พฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจและโปรตีน ทำให้ฟาจและโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติและโครงสร้างถูกทำลาย [18]-[19], [105]-[108], [20]-[22], [39], [57]-[58], [103]-[104] ความขัดแย้งกันของผลการศึกษามีเกิดขึ้นได้ คาดว่าน่าจะมีอิทธิพลมาจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ชนิดของฟาจและโปรตีนที่ศึกษา โดยความสัมพันธ์ระหว่างสารคงประสิทธิภาพกับฟาจและโปรตีนมีความจำเพาะไปในแต่ละชนิดของฟาจและโปรตีนที่ศึกษา
2. อิทธิพลของคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical property) ของแคปซิด ส่งผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างสารคงประสิทธิภาพกับฟาจและโปรตีนที่ศึกษา

ความแตกต่างของทั้งสองปัจจัยน่าจะทำให้ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษามีความต่างกัน โดยหนึ่งในปัจจัยที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการติดเชื้อของฟาจ คือปัจจัยการแยกกลุ่มกันของฟาจ (Segregate) สำหรับการทำหน้าที่เกาะแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มจำนวนฟาจ และฆ่าแบคทีเรีย [109] โดยเราคาดว่า การแยกกลุ่มกันของฟาจ C22 เกิดขึ้นระหว่างวิธีการทดสอบด้วยพลาค ในขั้นตอนการผสม

ตัวอย่างฟาจ C22 กับอาหารเหลว CPG ดังรูปที่ ค.7 โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกลุ่มกันเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของฟาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย หนึ่งในปัจจัยที่ส่งเสริมการแยกกลุ่มกันของฟาจ คือปัจจัยทางด้านกายภาพ (Physiological factor) เช่น pH และอุณหภูมิ ที่ช่วยให้ฟาจสามารถแยกกลุ่มกันเข้าไปเกาะแบคทีเรียได้ดีขึ้น

4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีการทูคี-เครเมอร์

วิธีการทูคี-เครเมอร์ถูกนำมาใช้สำหรับการทดสอบข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองหัวข้อ 4.1 4.2 และ 4.3 เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างผ่านโปรแกรม MATLAB ที่ช่วงความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

กลุ่มที่ 1 การทดสอบข้อมูลจากหัวข้อ 4.1 ด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ ซึ่งมีการทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ของสารคงประสิทธิภาพ 6 ชนิด ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งสำหรับระยะเวลาการจัดเก็บ 45 วันในรูปแบบสารละลาย (รูปที่ 4.1) โดยมีการทดสอบทั้งหมด 7 สภาวะ ได้แก่ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับกลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M ผลการจัดกลุ่มและค่าทางสถิติด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์แสดงในตาราง ข.2 สามารถแบ่งกลุ่มสารคงประสิทธิภาพเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ได้แก่ ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M
2. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ได้แก่ แมนนิทอล และซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M และฟาจที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพในสารละลายบัฟเฟอร์ MES
3. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตสที่ความเข้มข้น 0.5 M
4. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ต่ำ ได้แก่ กาแลคโตส และแลคโตสที่ความเข้มข้น 0.5 M

ผลการวิเคราะห์ผ่านวิธีการทูคี-เครเมอร์สามารถจัดกลุ่มสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีและเสียต่อฟาจ C22 สำหรับระยะเวลาการจัดเก็บ 45 วันในรูปแบบสารละลายได้อย่างชัดเจน สารคงประสิทธิภาพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M

กลุ่มที่ 2 การทดสอบข้อมูลจากหัวข้อ 4.2 ด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ ซึ่งมีการทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ของสารคงประสิทธิภาพ 3 ชนิดที่ถูกคัดเลือก (ซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอล) ภายหลังจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งสำหรับระยะเวลาการจัดเก็บ 90 วันในรูปแบบแห้ง (รูปที่ 4.2) โดยมีทดสอบทั้งหมด 10 สภาวะ ได้แก่ ฟาจ C22 ใน

สารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 M ผลการจัดกลุ่มและค่าทางสถิติด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์แสดงในตาราง ข.4 สามารถแบ่งกลุ่มสารคงประสิทธิภาพได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์สูง ได้แก่ ทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 M
2. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง ได้แก่ ทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.1 M และซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
3. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง ได้แก่ ซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.25 M
4. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่สามารถรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อยู่ในเกณฑ์ต่ำ ได้แก่ แมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 M และฟาจที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพในสารละลายบัฟเฟอร์ MES

ผลการวิเคราะห์ผ่านวิธีการทูคี-เครเมอร์สำหรับระยะเวลาการจับเก็บ 90 วันสำหรับฟาจ C22 ในรูปแบบแห้ง สามารถจัดกลุ่มสารคงประสิทธิภาพออกเป็น 4 กลุ่มอย่างชัดเจน สารคงประสิทธิภาพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 M

กลุ่มที่ 3 การทดสอบข้อมูลจากหัวข้อ 4.3 ด้วยวิธีการทูคี-เครเมอร์ ซึ่งมีการวิเคราะห์อิทธิพลของสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลต่อระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 โดยมีการวิเคราะห์ข้อมูลจากร้อยละความถี่สัมพัทธ์ของระดับการรวมกลุ่มของอนุภาคฟาจ C22 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) (รูปที่ 4.5) ผลการจัดกลุ่มและค่าทางสถิติแสดงในตาราง ข.6 สภาวะการทดลองแบ่งเป็น 4 สภาวะ ได้แก่ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพ ฟาจ C22 ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M สามารถแบ่งกลุ่มสภาวะการทดลองเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ได้แก่ ทรีฮาโลส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M
2. กลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่ไม่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ได้แก่ แมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M และฟาจที่ไม่ผสมสารคงประสิทธิภาพในสารละลายบัฟเฟอร์ MES

ผลการวิเคราะห์ผ่านวิธีการทูคี-เครเมอร์สำหรับ 4 สภาวะที่นำมาศึกษา สามารถจัดกลุ่มของสารคงประสิทธิภาพที่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 และสารคงประสิทธิภาพที่ไม่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 อย่างชัดเจน โดยผลของสารคงประสิทธิภาพที่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ทรีฮาโลส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยทิวซี-เครเมอร์ แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการเลือกสารคงประสิทธิภาพที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสารคงประสิทธิภาพส่งผลต่อความเข้มข้นฟาจโดยตรง ทั้งความสามารถในการรอดชีวิตของฟาจ ความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อของฟาจ ดังนั้นการหาสารคงประสิทธิภาพที่ดีควรพิจารณาคุณสมบัติในการรักษาโครงสร้าง ความเสถียร การรอดชีวิตของฟาจ และความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม โดยสารคงประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจทั้งก่อนและหลังกระบวนการ ได้แก่ ซูโครส และทรีฮาโลส

4.5 การวิเคราะห์หาสูตรที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 โดยวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

จากผลการทดลองหัวข้อ 4.1 ถึง 4.4 พบว่าสารคงประสิทธิภาพที่มีความสามารถในการคงสภาพฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งได้ดี ได้แก่ ซูโครส และทรีฮาโลส จึงได้มีการนำสารคงประสิทธิภาพทั้ง 2 ชนิดมาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการจัดเก็บรักษาฟาจ C22 โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของซูโครส และทรีฮาโลสร่วมกับปัจจัยอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ และปริมาตรของฟาจ ที่น่าจะเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของฟาจ C22 จากปัจจัยทั้งหมดที่ทำการศึกษา จึงมีการนำวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเข้ามาประยุกต์ใช้สำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (Factor) ต่อปัจจัยตอบสนอง (Response) และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งฟาจ C22 เพื่อรักษาประสิทธิภาพของฟาจในการเข้าทำลายเชื้อและยืดอายุการจัดเก็บรักษาฟาจ C22

ข้อมูลการทดลองถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ผ่านโปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 19 ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ปัจจัยทั้งหมดที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส (A) ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปริมาตรของฟาจ (D) และปัจจัยตอบสนองคือความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (Remaining phage titer) โดยแต่ละปัจจัยมีการศึกษา 3 ระดับ ได้แก่ ระดับ -1 0 และ 1 จำนวนการทดลอง 27 ลำดับแสดงในตารางที่ 3.1 และสามารถจำลองโมเดลสมการกำลังสองตามสมการที่ 3.1 ผลจากการจำลองโมเดลสมการกำลังสองสำหรับความเข้มข้นฟาจคงเหลือถูกแสดงตามสมการที่ 4.1 พร้อมค่า R-squared (R^2) = 84.20%

สมการกำลังสองสำหรับความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (Regression equation)

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ} &= 62.29 - 3.60A - 16.46B + 11.67C - 9.56D & (4.1) \\ &- 6.69A^2 - 13.51B^2 + 5.22C^2 - 15.47D^2 \\ &- 18.62A^2B + 25.51A^2C + 9.27A^2D - 8.12B^2C \\ &+ 22.87B^2D + 24.04C^2D \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (Remaining phage titer) จากการทดลองผ่านวิธีการ ออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับการศึกษา 4 ปัจจัยและ 1 ปัจจัยตอบสนอง

ลำดับการทดลอง	ตัวแปร (Coded variables)				ปัจจัยตอบสนอง
	A	B	C	D	ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ
1	-1	-1	0	0	40.44
2	1	-1	0	0	67.43
3	-1	1	0	0	57.66
4	1	1	0	0	10.18
5	0	0	-1	-1	56.28
6	0	0	1	-1	58.28
7	0	0	-1	1	1.4
8	0	0	1	1	99.55
9	-1	0	0	-1	52.27
10	1	0	0	-1	37.2
11	-1	0	0	1	24.92
12	1	0	0	1	46.93
13	0	-1	-1	0	68.63
14	0	1	-1	0	51.33
15	0	-1	1	0	73.3
16	0	1	1	0	23.53
17	-1	0	-1	0	75.95
18	1	0	-1	0	10.1
19	-1	0	1	0	56.42
20	1	0	1	0	92.61
21	0	-1	0	-1	97.58
22	0	1	0	-1	6.66
23	0	-1	0	1	10.12
24	0	1	0	1	10.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (Remaining phage titer) จากการทดลองผ่านวิธีการ ออกแบบบล็อกซ์-เบห์นเคนสำหรับการศึกษา 4 ปัจจัยและ 1 ปัจจัยตอบสนอง (ต่อ)

ลำดับการทดลอง	ตัวแปร (Coded variables)				ปัจจัยตอบสนอง
	A	B	A	B	ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ
25	0	0	0	0	66.11
26	0	0	0	0	60.47
27	0	0	0	0	60.29

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) สำหรับกระบวนการ ทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	14	17849.6	1274.97	4.57	0.006
Linear	4	6134.2	1533.56	5.49	0.009
A	1	155.6	155.62	0.56	0.47
B	1	3249.5	3249.5	11.64	0.005
C	1	1633.3	1633.26	5.85	0.032
D	1	1095.8	1095.85	3.93	0.071
Square	4	2715.1	678.78	2.43	0.105
A*A	1	238.8	238.76	0.86	0.373
B*B	1	973.9	973.88	3.49	0.086
C*C	1	145.2	145.22	0.52	0.485
D*D	1	1276.9	1276.88	4.57	0.054
2-Way Interaction	6	9000.2	1500.04	5.37	0.007
A*B	1	1386.6	1386.57	4.97	0.046
A*C	1	2603.4	2603.41	9.33	0.01
A*D	1	343.9	343.87	1.23	0.289
B*C	1	263.6	263.6	0.94	0.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 (ต่อ)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
B*D	1	2091.6	2091.6	7.49	0.018
C*D	1	2311.2	2311.17	8.28	0.014
Error	12	3349.7	279.14		
Lack-of-Fit	10	3327.8	332.78	30.34	0.032
Pure Error	2	21.9	10.97		
Total	26	21199.3			

จากตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) กำหนดช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% โดยค่า P-value บ่งบอกถึงความสำคัญของปัจจัยในกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 [85], [110] สามารถแปลผลจากค่า P-value ได้แก่

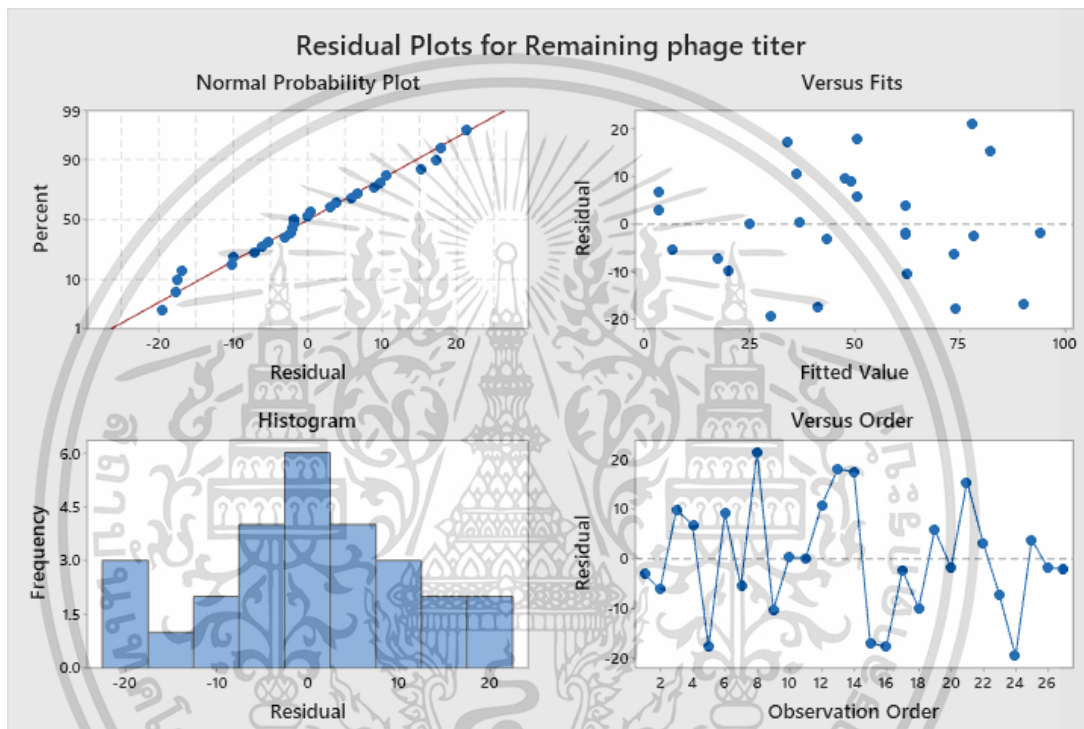
1. ถ้าค่า P-value ของปัจจัยน้อยกว่า 0.05 ($P\text{-value} < 0.05$) คือปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22
2. ถ้าค่า P-value ของปัจจัยมากกว่า 0.05 ($P\text{-value} > 0.05$) คือปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

ปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ได้แก่ ปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) ความแข็งแรงไอออนของบีฟเฟอร์ (C) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส ($A*B$) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบีฟเฟอร์ ($A*C$) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ ($B*D$) และปัจจัยร่วมของความแข็งแรงไอออนของบีฟเฟอร์และปริมาตรของฟาจ ($C*D$) นอกเหนือจากปัจจัยที่กล่าวมาเป็นปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

เมื่อนำปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมที่มีนัยสำคัญจากสมการที่ 4.1 เข้ามาพิจารณาเครื่องหมายของสัมประสิทธิ์ที่คุณอยู่ด้านหน้าแต่ละปัจจัย ซึ่งทำหน้าที่บอกความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ โดยเครื่องหมายของสัมประสิทธิ์สามารถเหมือน หรือต่างกันได้ระหว่างปัจจัยหลัก และปัจจัยร่วมที่มีส่วนประกอบของปัจจัยหลักนั้นๆ เช่น เครื่องหมายของปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ ($B*D$) ที่มีเครื่องหมายของสัมประสิทธิ์ต่างกัน ส่งผลต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือที่ต่างกัน โดยสัมประสิทธิ์ที่มีเครื่องหมายบวก ส่งผลในทางเดียวกับความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ขณะที่สัมประสิทธิ์ที่มีเครื่องหมายลบ ส่งผลในทางตรงกันข้ามกับความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ซึ่งหมายความว่าปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งผลให้ความเข้มข้นฟาจคงเหลือเพิ่มขึ้น ขณะที่ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) ลดลง ส่งผลให้ความเข้มข้นฟาจคงเหลือลดลง และพบปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ (B^*D) ส่งผลต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือในทางตรงกันข้ามกับปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) ขณะที่ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (A^*C) มีเครื่องหมายของสัมประสิทธิ์เหมือนกัน จึงส่งผลต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือเหมือนกัน

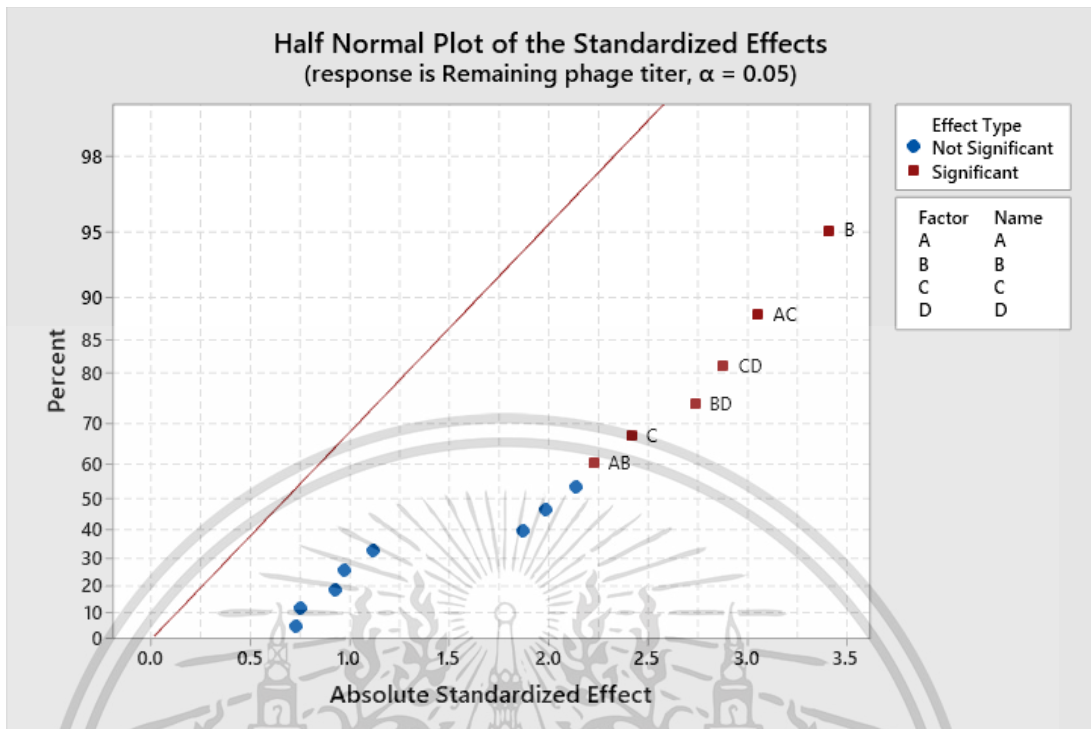


รูปที่ 4.6 กราฟ Residual plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

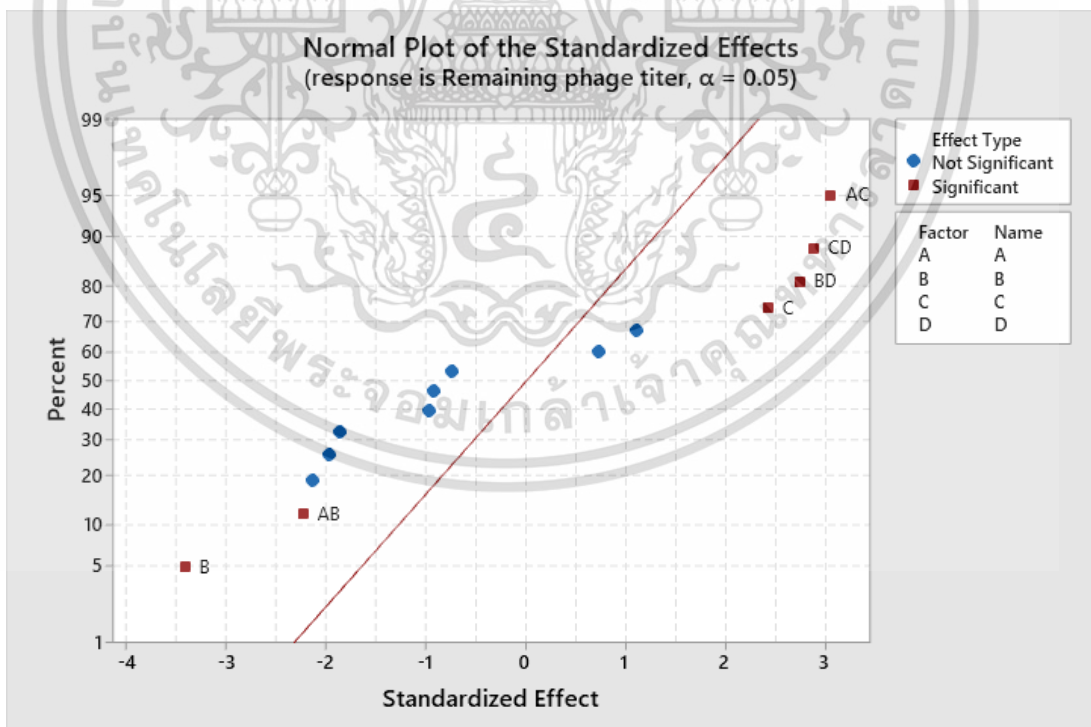
รูปที่ 4.6 แสดงกราฟ Residual plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 กราฟ Residual plot ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบความปกติของข้อมูลการทดลอง โดยค่า Residual คือค่าความแตกต่างของข้อมูลจากการทดลองกับข้อมูลจากการทำนายของโมเดลสมการกำลังสอง [85], [111] ภายในกราฟประกอบด้วยกราฟทดสอบทั้งหมด 4 แบบ ได้แก่

1. กราฟความน่าจะเป็นปกติ (Normal probability plot) แสดงข้อมูลการกระจายตัวแบบปกติตามแนวเส้นตรง
2. กราฟ Residual versus fits แสดงข้อมูลกระจายแบบสุ่ม อย่างมีอิสระต่อกัน
3. กราฟฮิสโตแกรม (Histogram) แสดงข้อมูลกระจายตัวแบบปกติ
4. กราฟ Residual versus order แสดงข้อมูลกระจายแบบสุ่ม อย่างมีอิสระต่อกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟ Half normal plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

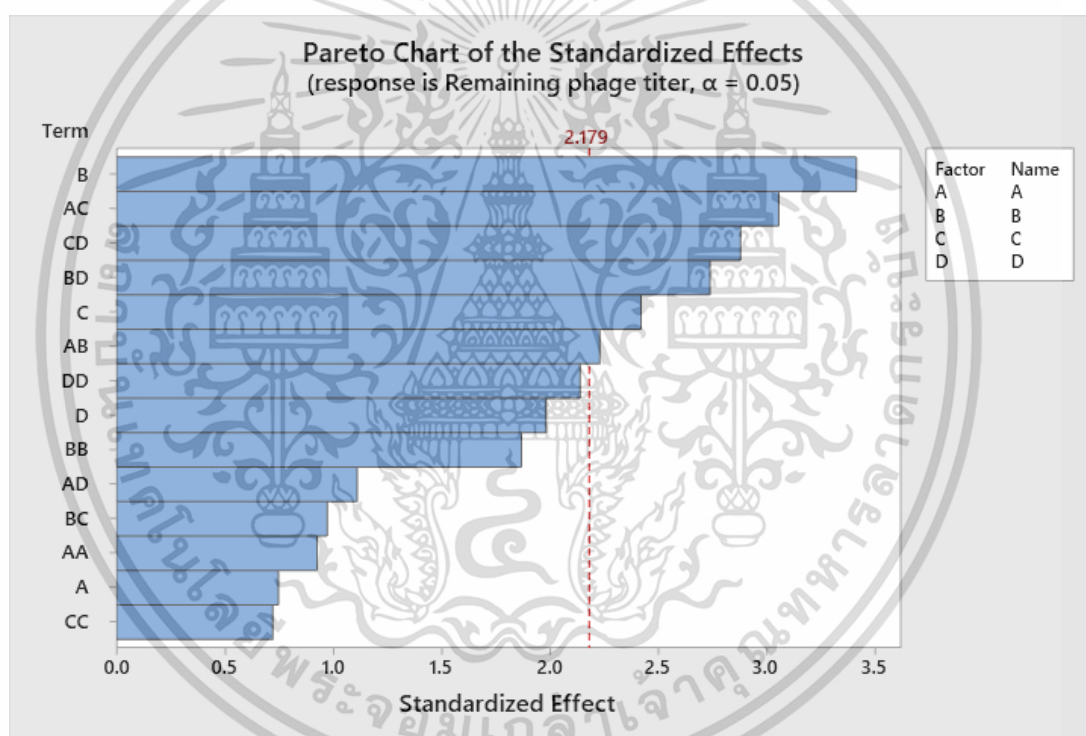


รูปที่ 4.8 กราฟ Normal plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 และ 4.8 แสดงกราฟ Half normal plot และ Normal plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ทำหน้าที่ในการวิเคราะห์นัยสำคัญของปัจจัย โดยค่า Standardized effect บอกขนาดความสำคัญของปัจจัย [85], [112]-[113]

ผลลัพธ์จากรูปที่ 4.7 และ 4.8 สอดคล้องกับผลลัพธ์จากตารางที่ 4.2 บริเวณจุดสีแดง แสดงปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ได้แก่ ปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส (A*B) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (A*C) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ (B*D) และปัจจัยร่วมของความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์และปริมาตรของฟาจ (C*D) ขณะที่บริเวณจุดสีน้ำเงิน แสดงปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22



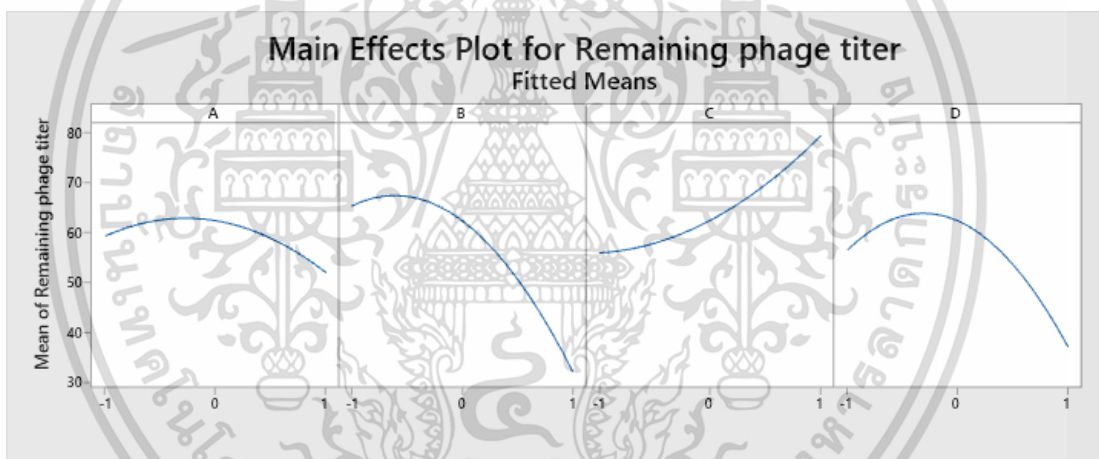
รูปที่ 4.9 กราฟพารेट (Pareto chart) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

รูปที่ 4.9 แสดงกราฟพารेट (Pareto chart) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ทำหน้าที่ตรวจสอบหาขนาดและความสำคัญของปัจจัยผ่านค่า Standardized effect ความสำคัญของปัจจัยถูกเรียงลำดับความสำคัญจากบนลงล่าง และกราฟของปัจจัยที่ข้ามเส้นสีแดง (หรือเส้นอ้างอิง) ถือว่าเป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงค่าของปัจจัยที่มีนัยสำคัญทางสถิติมีความสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 [85], [112]

จากกราฟพาเรโต มีเส้นอ้างอิงเท่ากับ 2.179 สามารถเรียงลำดับความสำคัญของปัจจัยตามลำดับดังนี้

1. ปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B)
2. ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (A*C)
3. ปัจจัยร่วมของความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์และปริมาตรของฟาจ (C*D)
4. ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ (B*D)
5. ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C)
6. ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส (A*B)

อย่างไรก็ตาม กราฟพาเรโตไม่สามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมที่ส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ จึงมีการวิเคราะห์ตรวจสอบความสัมพันธ์เพิ่มเติมของปัจจัยหลักด้วยกราฟ Main effects plot และปัจจัยร่วมด้วยกราฟ Interaction plot เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยหลักและปัจจัยร่วมว่าส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลืออย่างไร



รูปที่ 4.10 กราฟ Main effects plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

กราฟ Main effects plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 แสดงในรูปที่ 4.10 นำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ โดยลักษณะของเส้นกราฟแสดงอิทธิพลของปัจจัยหลักต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือทั้งเชิงบวกและเชิงลบ [85], [114] สามารถแบ่งได้ดังนี้

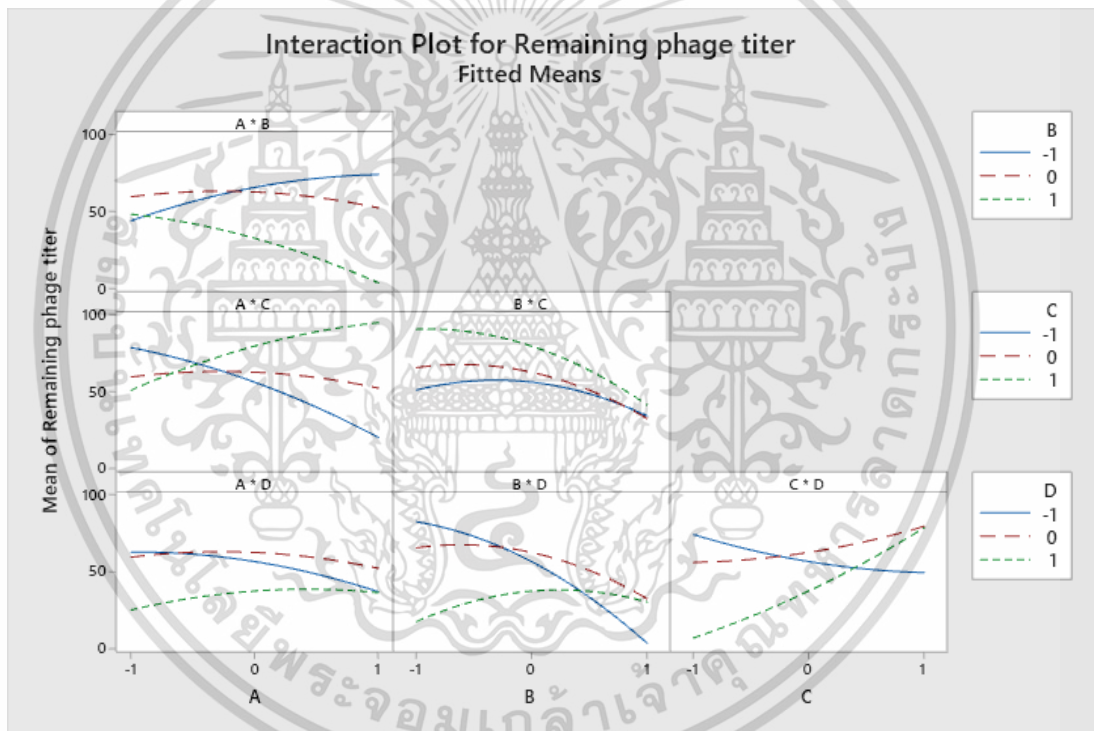
1. ถ้าเส้นกราฟของปัจจัยหลักอยู่ในแนวนอน บ่งบอกว่าการเปลี่ยนแปลงค่าของปัจจัยหลักไม่ส่งผลต่อปัจจัยตอบสนอง (ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ)
2. ถ้าเส้นกราฟของปัจจัยหลักไม่ได้อยู่ในแนวนอน แบ่งออกเป็น
 - 2.1. เส้นกราฟของปัจจัยหลักมีความชันน้อยกว่า 0 (ลบ) บ่งบอกว่าการเปลี่ยนแปลงค่า

ของปัจจัยหลัก ส่งผลทางด้านลบต่อค่าของปัจจัยตอบสนอง (ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลือ) แปลว่าการเพิ่มขึ้นของค่าปัจจัยหลัก ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือลดลง ในทางกลับกันการลดลงของค่าปัจจัยหลัก ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงขึ้น ซึ่งตรงกับกรณีของปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครส (A) ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) ดังแสดงในรูปที่ 4.10

2.2. เส้นกราฟของปัจจัยหลักมีความชันมากกว่า 0 (บวก) บ่งบอกว่าการเปลี่ยนแปลงค่าของปัจจัยหลัก ส่งผลทางด้านบวกต่อค่าของปัจจัยตอบสนอง (ความเข้มข้นฟาจคงเหลือ) แปลว่าการเพิ่มขึ้นของค่าปัจจัยหลัก ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงขึ้น ในทางกลับกันการลดลงของค่าปัจจัยหลัก ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือลดลง ซึ่งตรงกับกรณีของปัจจัยหลัก ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) ดังแสดงในรูปที่ 4.10



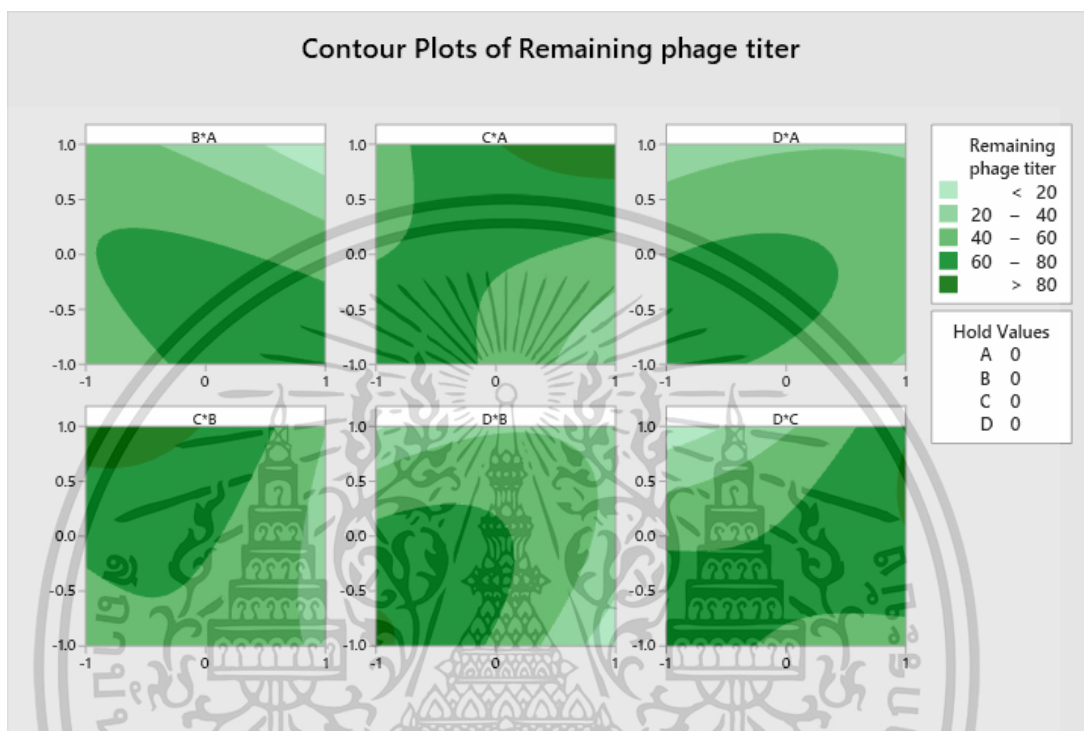
รูปที่ 4.11 กราฟ Interaction plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

กราฟ Interaction plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 แสดงในรูปที่ 4.11 นำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยร่วมต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ลักษณะการตัดกันของเส้นกราฟ บอกลถึงความสำคัญของปัจจัยร่วมที่มีต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 โดยการตัดกันของเส้นกราฟที่เพิ่มขึ้น เพิ่มความสำคัญของปัจจัยร่วม [85], [115]

จากกราฟ Interaction plot แสดงปัจจัยร่วมที่มีนัยสำคัญ ได้แก่ ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส (A*B) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของ

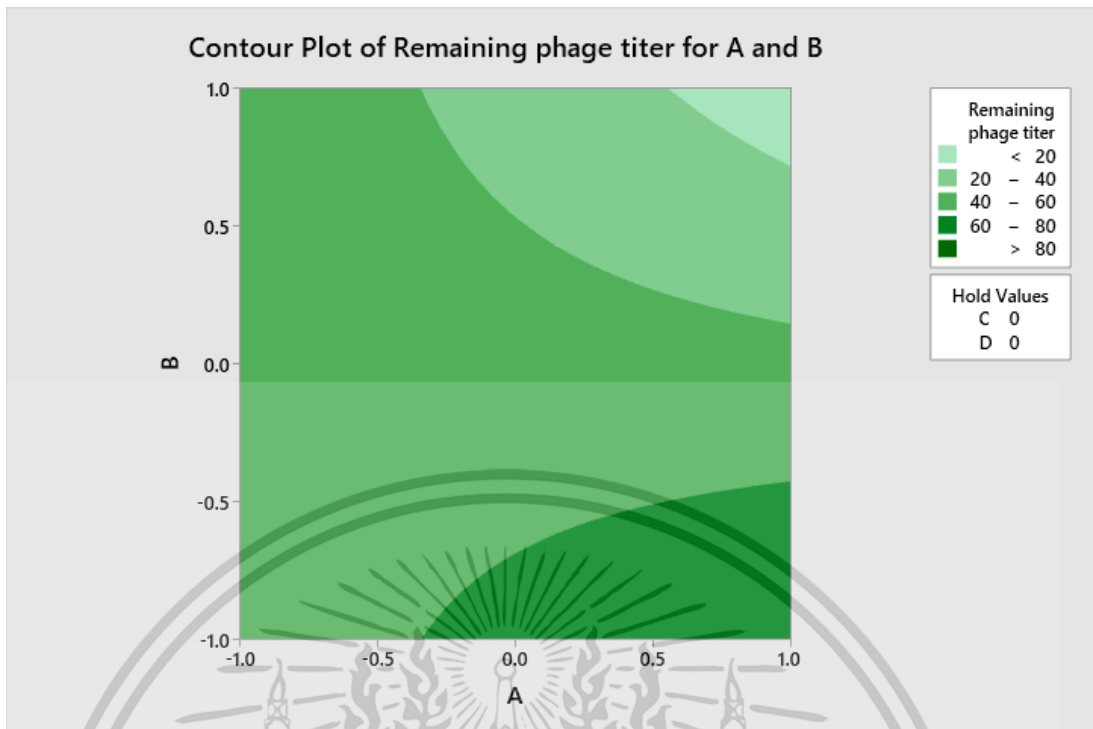
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัพเฟอร์ (A*C) ปักจ้ยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ (B*D) และปักจ้ยร่วมของความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์และปริมาตรของฟาจ (C*D) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากกราฟ Interaction plot มีความสอดคล้องกับผลลัพธ์ที่ได้จากกราฟพาเรโตและตารางที่ 4.2 ANOVA ที่บ่งบอกปักจ้ยร่วมที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

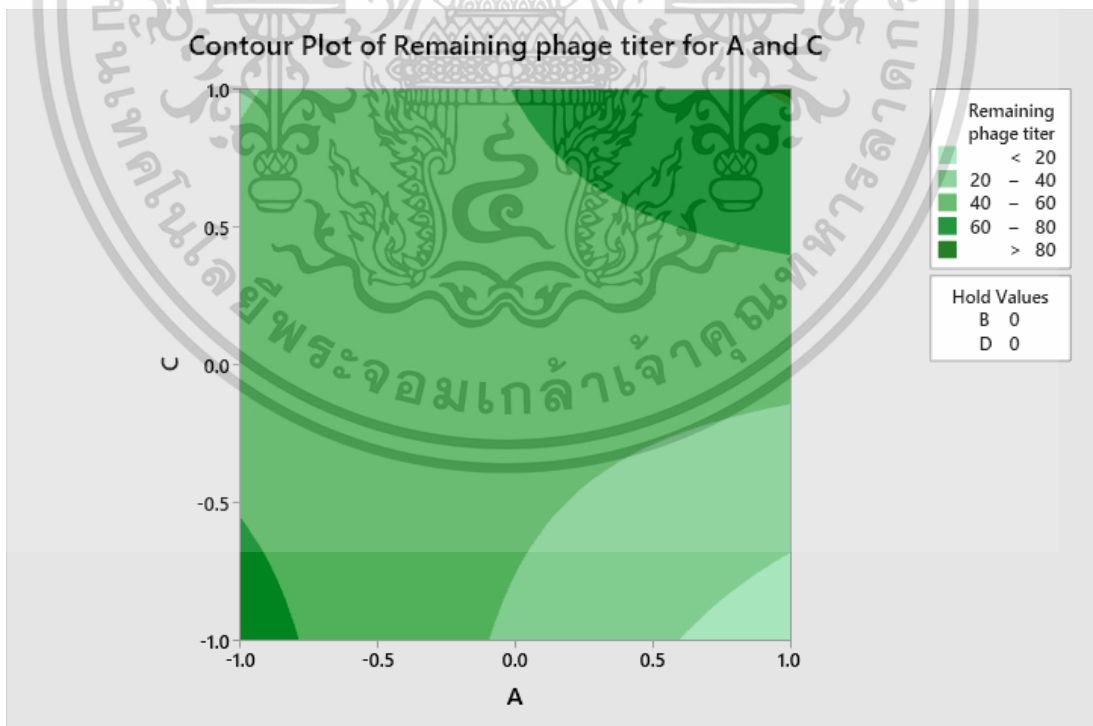


รูปที่ 4.12 กราฟ Contour plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

กราฟ Contour plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ในรูปที่ 4.12 แสดงผลในภาพ 2 มิติถูกนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ และพฤติกรรมของปักจ้ย 2 ตัวแปร ซึ่งถูกแสดงบนแกนแนวนอนในระนาบ และแนวตั้งในระนาบ (กำหนดให้เป็นแกน x และ y ตามลำดับ) ต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ (ปักจ้ยตอบสนอง) ซึ่งถูกแสดงค่าผ่านเขตสี (Shaded region) ความเข้มของเขตสีเขียวบ่งบอกถึงค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ถ้าเขตสีเขียวมีความเข้มมากขึ้น ค่าของความเข้มข้นฟาจคงเหลือจะสูงขึ้น [85], [116] โดยรูปที่ 4.13 ถึง 4.16 แสดงกราฟ Contour plot ของปักจ้ยร่วมที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

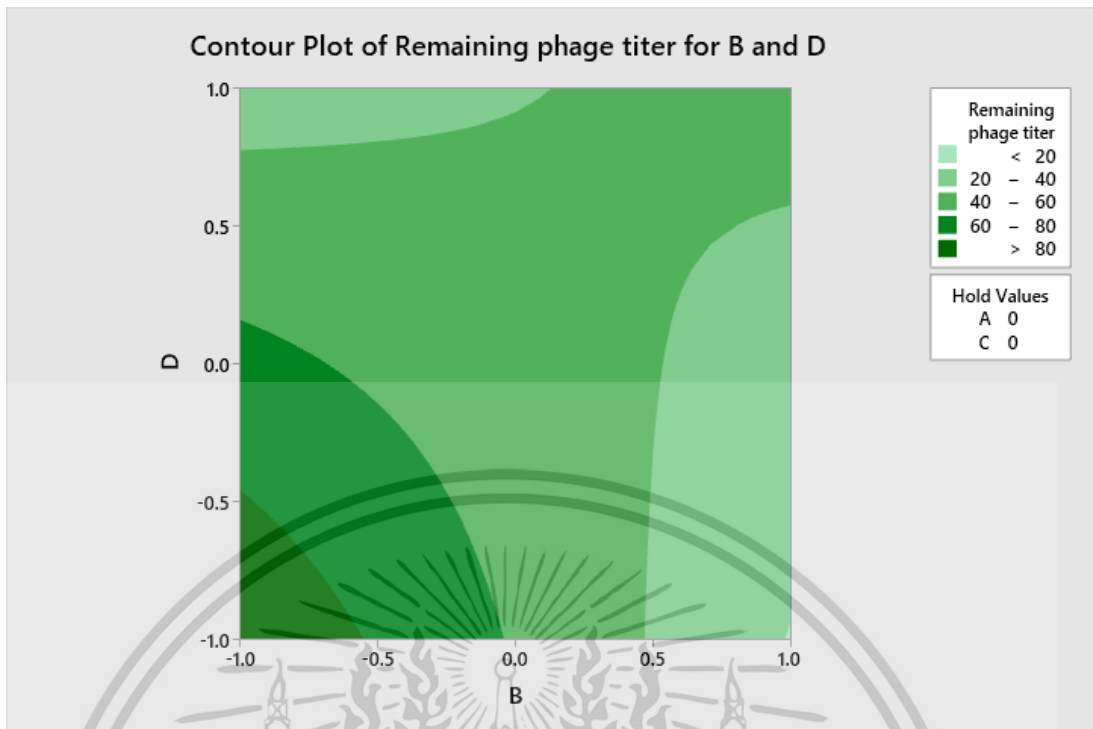


รูปที่ 4.13 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) และความเข้มข้นของ ทรีฮาโลส (B) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

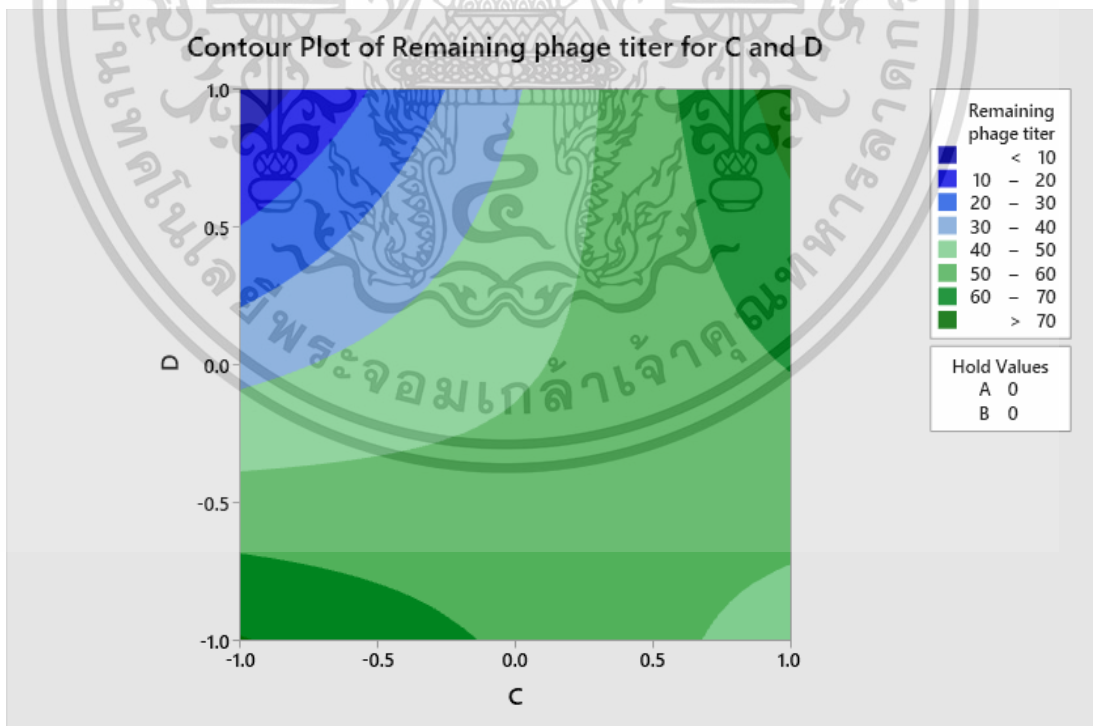


รูปที่ 4.14 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) และความแข็งแรงไอออนของ บัฟเฟอร์ (C) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22



รูปที่ 4.16 กราฟ Contour plot ของปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปริมาตรของฟาจ (D) สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

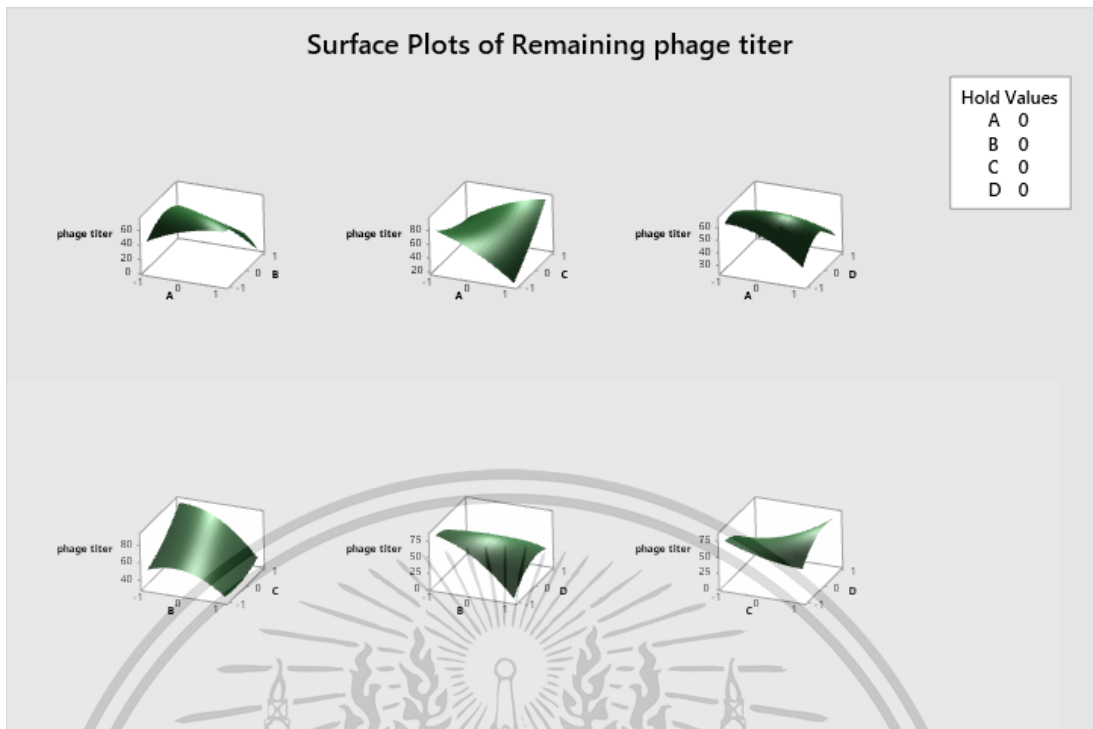
รูปที่ 4.13 แสดงกราฟ Contour plot สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) และความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) พบว่าค่าของความเข้มข้นฟาจคงเหลือของกราฟ Contour plot มีการไล่ระดับเฉดสีเขียวเข้มขึ้นจากบนลงล่างและค่าของความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงสุดอยู่บริเวณด้านขวาล่างของกราฟ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีค่าความเข้มข้นของซูโครส (A) อยู่ในระดับสูงสุดและความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) อยู่ในระดับต่ำสุด

รูปที่ 4.14 แสดงกราฟ Contour plot สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) และความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) พบว่าค่าของความเข้มข้นฟาจคงเหลือของกราฟ Contour plot มีค่าสูงอยู่บริเวณมุมซ้ายล่างและมุมขวาบน สันเกตได้จากเฉดความเข้มของสีเขียว และค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือตั้งแต่ระดับต่ำจนถึงปานกลางอยู่บริเวณตรงกลางของกราฟ สันเกตได้จากเฉดสีเขียวที่อ่อนลงมา โดยบริเวณที่พบค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงสุด คือมุมขวาบน ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของซูโครส (A) และความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) อยู่ในระดับสูง

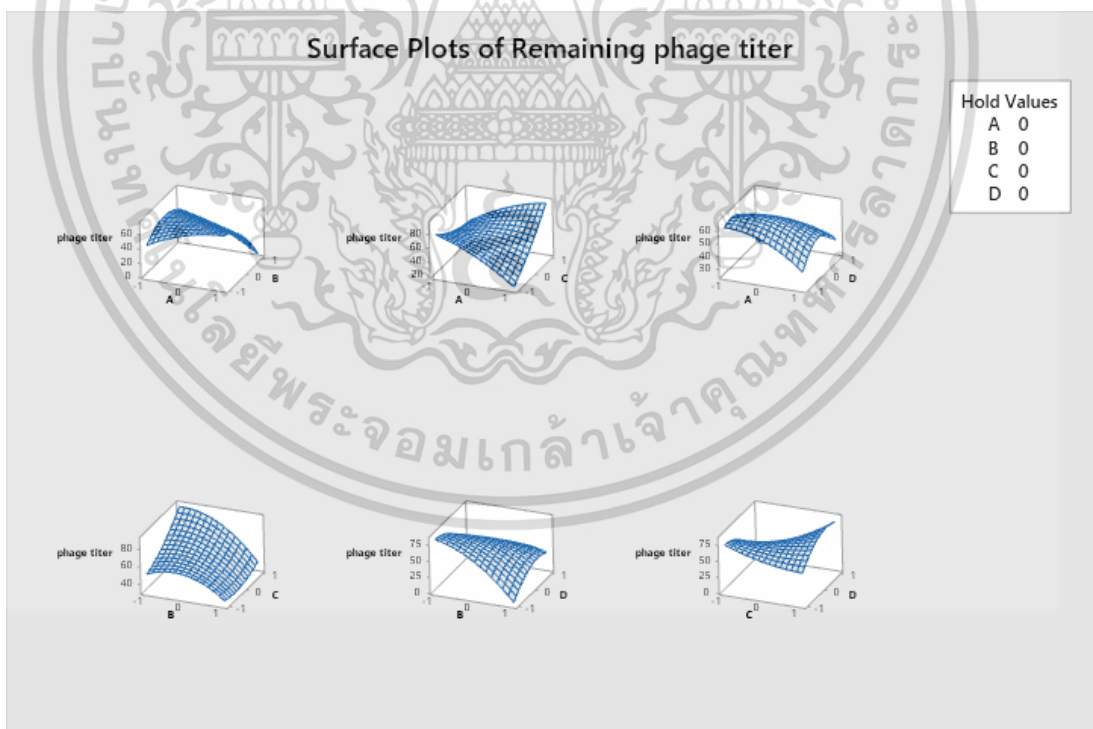
รูปที่ 4.15 แสดงกราฟ Contour plot สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) พบว่าค่าของความเข้มข้นฟาจคงเหลือของกราฟ Contour plot มีการไล่ระดับเฉดสีเข้มขึ้นจากบริเวณด้านล่างขวาและด้านซ้ายบนลงมาบริเวณตรงกลางและมีการไล่เฉดสีเข้มขึ้นลงมาจากบริเวณซ้ายล่างของกราฟ ซึ่งเป็นบริเวณที่พบความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงสุด โดยบริเวณนี้มีระดับค่าความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) ในระดับต่ำ

รูปที่ 4.16 แสดงกราฟ Contour plot สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปริมาตรของฟาจ (D) พบว่าค่าของความเข้มข้นฟาจคงเหลือของกราฟ Contour plot มีการไล่ระดับเฉดสีเข้มขึ้นจากบริเวณซ้ายบนและขวาล่างขึ้นไปบริเวณตรงกลาง ขณะที่พบเฉดสีเขียวเข้มอยู่บริเวณซ้ายล่างและขวาบนของกราฟ โดยบริเวณที่พบค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงสุด คือบริเวณขวาบน ซึ่งมีระดับความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปริมาตรของฟาจ (D) ในระดับสูง

กราฟ Surface plot ในรูปที่ 4.17 และกราฟ Surface plot แสดงผลแบบ Wireframe ในรูปที่ 4.18 สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ทั้งสองกราฟถูกนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 3 ตัวแปร ได้แก่ ปัจจัยหลัก 2 ตัวแปรและปัจจัยตอบสนอง 1 ตัวแปร โดยปัจจัยหลักแสดงในแกนแนวนอนในระนาบและแนวตั้งในระนาบ ปัจจัยตอบสนองแสดงในแกนแนวตั้งฉากกับระนาบ ความต่างของกราฟ Contour plot และ Surface plot (รูปที่ 4.17 และ 4.18) คือกราฟ Surface plot ถูกนำเสนอในรูปแบบ 3 มิติต่างจากกราฟ Contour plot (รูปที่ 4.12) ถูกนำเสนอในรูปแบบ 2 มิติ

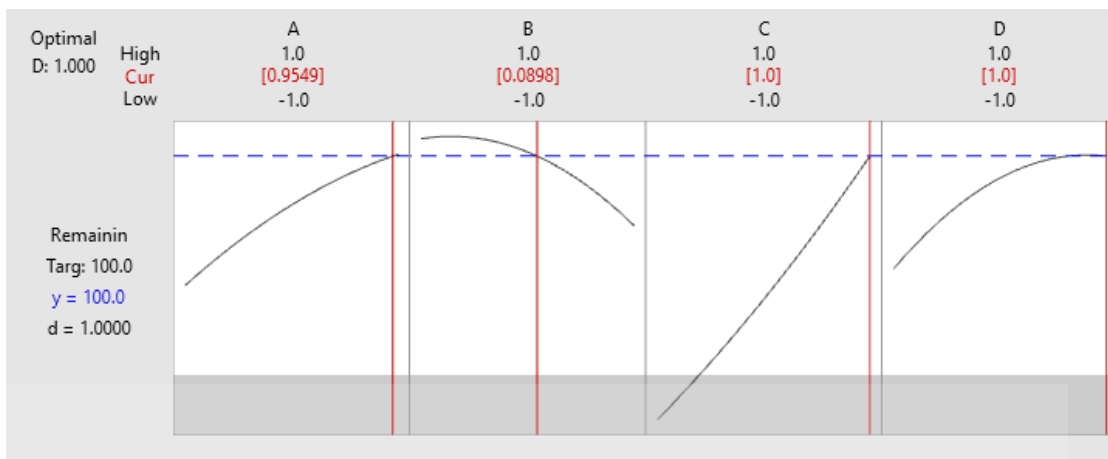


รูปที่ 4.17 กราฟ Surface plot สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22



รูปที่ 4.18 กราฟ Surface plot แสดงผลแบบ Wireframe สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 เครื่องมือ Response optimizer สำหรับการสุทธที่เเหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22

สมการสำหรับการหาค่าจริงของปัจจัย (Actual value) จาก Coded variable [117]

$$\text{Coded variable} = \frac{(\text{ค่าจริงของปัจจัย} - \text{ค่าเฉลี่ยของปัจจัย})}{\text{ครึ่งหนึ่งของช่วงปัจจัยที่ศึกษา}} \quad (4.2)$$

ผลจากการหาสุทธที่เเหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ด้วยเครื่องมือ Response optimizer ในรูปที่ 4.19 พบว่าสุทธที่เเหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ประกอบด้วยความเข้มข้นของซูโครส (A) เท่ากับ 0.95 ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) เท่ากับ 0.09 ความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์ (C) เท่ากับ 1 และปริมาตรของฟาจ (D) เท่ากับ -1 โดยตัวเลขถูกแสดงใน Coded variable สามารถแปลงเป็นค่าจริงตามสมการที่ 4.2 พบว่าความเข้มข้นของซูโครส (A) เท่ากับ 0.48 M ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) เท่ากับ 0.27 M ความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์ (C) เท่ากับ 0.24 M และของปริมาตรฟาจ (D) เท่ากับ 300 ไมโครลิตร ส่งผลให้ได้ความเข้มข้นฟาจคงเหลือเท่ากับ 100%

ผลจากวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนที่ความเชื่อมั่น 95% (CI = 95%) พบว่าปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้

1. ปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B)
2. ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์ (A*C)
3. ปัจจัยร่วมของความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์และปริมาตรของฟาจ (C*D)
4. ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ (B*D)
5. ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์ (C)
6. ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส (A*B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาปัจจัยหลักจากกราฟ Main effects plot พบว่าความเข้มข้นของซูโครส (A) ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) ส่งผลทางด้านลบต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ขณะที่ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) ส่งผลทางด้านบวกต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 จากเครื่องมือ Response optimizer ประกอบด้วยความเข้มข้นของซูโครส (A) เท่ากับ 0.48 M ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) เท่ากับ 0.27 M ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) เท่ากับ 0.24 M และปริมาตรของฟาจ (D) เท่ากับ 300 ไมโครลิตร ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือ 100%

โดยผลลัพธ์ที่ได้เครื่องมือ Response optimizer เป็นการค้นหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ซึ่งเป็นการค้นหาความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงสุดจากองค์ประกอบของปัจจัยหลักทั้ง 4 ปัจจัยร่วมกัน ต่างจากผลลัพธ์ที่ได้จากกราฟ Main effects plot ที่มีการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือทีละปัจจัย ทำให้ผลที่ได้จากเครื่องมือ Response optimizer และกราฟ Main effects plot อาจสอดคล้อง หรือไม่สอดคล้องกัน ยกตัวอย่างเช่น จากกราฟ Main effects plot พบว่าความเข้มข้นของซูโครส (A) ควรจะมีความเข้มข้นต่ำที่สุด ถึงจะสามารถรักษาความเข้มข้นฟาจคงเหลือได้สูงสุด แต่จากเครื่องมือ Response optimizer พบว่าเมื่อความเข้มข้นของซูโครส (A) มีความเข้มข้นเกือบสูงที่สุด (เท่ากับ 0.48 M) ถึงจะให้ค่าความเข้มข้นของฟาจคงเหลือสูงสุด ขณะที่ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) มีผลลัพธ์ที่ได้จากทั้งเครื่องมือ Response optimizer และกราฟ Main effects plot สอดคล้องกัน โดยพบว่าการหากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ควรมีการใช้ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) สูงสุด เพื่อให้ได้ความเข้มข้นฟาจคงเหลือสูงสุด

นอกจากนี้ผลจากโปรแกรม Minitab แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 4 ปัจจัยที่ศึกษาต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 หลายงานวิจัยมีความเห็นสอดคล้องกันว่า ซูโครสและทรีฮาโลสมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการทำแห้งฟาจและโปรตีน เนื่องจากซูโครสและทรีฮาโลสมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพธรรมชาติของฟาจและโปรตีน [17], [22], [76], [80], [118] สำหรับการศึกษาระบบการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ผ่านวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ผลลัพธ์จากโปรแกรม Minitab พบว่าความเข้มข้นของทรีฮาโลสเป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญมากที่สุดต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ดังนั้นทรีฮาโลสมีบทบาทสำคัญในการกำหนดทิศทางของกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ โดยผลการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ของทรีฮาโลส มีความสอดคล้องกับในหลายงานวิจัยที่พิสูจน์ว่า ทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพที่ดีที่สุดสำหรับการรักษาสภาพฟาจและโปรตีนจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง [17], [22], [76], [80], [118] นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของทรีฮาโลส มีแนวโน้มส่งผลเสียต่อความเข้มข้นฟาจ C22 ซึ่งแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของทรีฮาโลสส่งผลเสียต่อฟาจขัดแย้งกับในการศึกษาของ Merabishvili และคณะ ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของทรีฮาโลส ช่วยเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของฟาจ ISP [22]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลซูโครส พบนัยสำคัญเมื่ออยู่ร่วมกับปัจจัยอื่น ได้แก่ ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของ บัฟเฟอร์ (C) และความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) สำหรับปัจจัยแรกที่มีนัยสำคัญ คือปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (A^*C) พบว่าการใช้ซูโครสร่วมกับ บัฟเฟอร์ MES เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ผลลัพธ์ที่ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Dini และคณะ ที่มีการศึกษาการใช้ซูโครสร่วมกับบัฟเฟอร์ PBS ในฟาจ CA933P วงศ์โพลีไวรัส พบว่าการใช้ส่วนผสมของซูโครสที่ความเข้มข้น 0.1 M กับบัฟเฟอร์ PBS มี ประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ CA933P ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งได้ดี เมื่อเทียบกับการใช้บัฟเฟอร์ PBS เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ [78] ซึ่งผลการทดลองที่ได้ เหมือนกับผลการทดลองในฟาจ C22 ที่พบว่าการใช้ซูโครสร่วมกับบัฟเฟอร์ MES มีนัยสำคัญของ ปัจจัยมากกว่าการใช้บัฟเฟอร์ MES เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้อีกหนึ่งปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อ กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 คือปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส (A^*B) การศึกษาส่วนผสมของซูโครสและทรีฮาโลสไม่ได้รับความนิยมน่าจะเกิดจากซูโครสและ ทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจได้ดี ทั้งผลลัพธ์ที่ใช้ซูโครสและ ทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาร่วมกันจึงมีความสนใจ เกี่ยวกับการนำซูโครสและทรีฮาโลสใช้ร่วมกับสารคงประสิทธิภาพชนิดอื่นๆ เช่น การนำซูโครสและ ทรีฮาโลสผสมกับน้ำตาลแอลกอฮอล์ โพรตีน พอลิเมอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคงสภาพฟาจ [39] โดยสำหรับฟาจ C22 เราคาดว่า การนำซูโครสและทรีฮาโลสมาใช้ร่วมกันน่าจะเป็นสารคง ประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อการรักษาความเสถียรของฟาจ C22 เนื่องจากผลการทดลองได้พิสูจน์ว่า ซูโครสและทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพที่ดี และมีความสามารถในการคงสภาพฟาจ C22

ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) และปัจจัยร่วมของความแข็งแรงไอออนของ บัฟเฟอร์และปริมาตรของฟาจ (C^*D) พบว่ามีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่าความแข็งแรงไอออนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ ส่งผลต่อ โครงสร้างและความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อของฟาจ [15], [20] โดยสภาวะที่มีความเข้มข้นของ เกลือหรือความแข็งแรงไอออนที่เหมาะสม ช่วยรักษาฟาจเมื่อต้องเผชิญกับสภาวะที่รุนแรงได้ดี ขณะที่ สภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนน้อยหรือมากเกินไป อาจส่งผลให้ฟาจเสื่อมสภาพ และนำไปสู่ โครงสร้างของฟาจถูกทำลายจากการเกิด Osmotic shock [78] จากการศึกษาความแข็งแรงไอออน ในฟาจ C22 พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของความแข็งแรงไอออน ส่งผลดีต่อการรักษาความเข้มข้นของ ฟาจ C22 ผลการศึกษาค้นคว้ากับการศึกษาของ Furiga และคณะ ที่พบว่าฟาจ MS2 สามารถคงความ เสถียรได้ดี เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนสูง นอกจากนี้ Furiga และคณะ ยังเสนอว่า แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างฟาจ MS2 [119] ขณะที่การศึกษาของ Dini และ Urraza ทดสอบความเสถียรของฟาจ CA933P โดยการใช้ บัฟเฟอร์ SM ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน ได้แก่ บัฟเฟอร์ SM และ SM 10% ผลการศึกษา พบว่า

การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ SM สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ CA933P เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเทียบกับการใช้บัพเฟอร์ SM ที่มีความเข้มข้นของเกลือปกติ ไม่มีความแตกต่างของความสามารถในการติดเชื้อของฟาจอย่างมีนัยสำคัญ [78] Szermer-Olearnik และคณะ ศึกษาการเพิ่มจำนวนฟาจ T4 โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนต่ำและสูง พบว่าฟาจ T4 สามารถรักษาความเสถียรได้ดีในสภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนต่ำมากกว่าสภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนสูง เนื่องจากสภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนต่ำ กระตุ้นฟาจ T4 ให้เกิดการรวมกลุ่มกัน เพื่อปกป้องฟาจ T4 จากสภาพแวดล้อมที่รุนแรง [102] จากงานวิจัยข้างต้น อาจสรุปได้ว่า ความสามารถในการรักษาสภาพฟาจ ขึ้นอยู่กับชนิดของฟาจและการเลือกใช้บัพเฟอร์เพื่อสร้างสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการจัดเก็บรักษาฟาจ โดยมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเสถียรของฟาจ พบความแตกต่างของผลการศึกษา เมื่อมีการใช้ฟาจและบัพเฟอร์ต่างชนิดกัน ตัวอย่างการศึกษาของ Governal และ Gerba พบความแตกต่างในการรักษาความเสถียรของฟาจ MS2 และ PRD1 ระหว่างการใช้น้ำประปาและน้ำ Ultrapure ผลลัพธ์จากการศึกษา พบว่าฟาจ PRD1 มีประสิทธิภาพในการรักษาความเสถียรมากกว่าฟาจ MS2 ที่มีความไวต่อปัจจัยภายนอก เช่น pH คุณภาพของน้ำ มากกว่าฟาจ PRD1 ที่สามารถรักษาความเสถียรได้ดีภายใต้ทุกสภาวะการทดลอง [47] และการศึกษาของ Dini และ Urraza ศึกษาการใช้บัพเฟอร์ PBS และ SM ในฟาจ CA933P พบว่าบัพเฟอร์ PBS และ SM มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นฟาจ CA933P ต่างกัน โดยบัพเฟอร์ PBS ไม่มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นฟาจ CA933P ขณะที่บัพเฟอร์ SM มีความสามารถในการรักษาความเข้มข้นฟาจ CA933P ได้ดีภายใต้สภาวะเดียวกัน [78] ดังนั้นการเลือกใช้บัพเฟอร์อย่างเหมาะสมสำหรับการทำแห้งและการจัดเก็บรักษาฟาจถือเป็นปัจจัยสำคัญ ส่งผลต่อความเสถียรโครงสร้าง และระยะเวลาการจัดเก็บฟาจ โดยการเลือกใช้บัพเฟอร์อย่างเหมาะสม ช่วยเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของฟาจ ทำให้ฟาจสามารถทนต่อสภาพแวดล้อม ปัจจัยภายนอกที่ไม่พึงประสงค์ได้ดี [15] ผลการศึกษาของฟาจ C22 ในงานนี้ พบว่าสภาวะที่มีความแข็งแรงไอออนสูง (ความแข็งแรงไอออนของบัพเฟอร์ $MES = 0.24 M$) น่าจะส่งเสริมกลไกการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 โดยกลไกการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ส่งผลต่อการรักษาโครงสร้างของฟาจ C22 ทำให้ฟาจ C22 สามารถทนความเครียดระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งได้ดีขึ้น เหมือนที่พบในการศึกษาของ Szermer-Olearnik และคณะ ที่มีการนำเสนอว่าการเกิดการรวมกลุ่มกันของฟาจ T4 ช่วยปกป้องฟาจ T4 จากการสูญเสียการรอดชีวิตภายใต้สภาพแวดล้อมที่รุนแรง [102]

สุดท้ายปัจจัยปริมาตรของฟาจ (D) พบมีนัยสำคัญเมื่อรวมกับความแข็งแรงไอออน ($C * D$) และทรีฮาโลส ($B * D$) อาจเนื่องมาจากปริมาณฟาจ C22 ที่มากขึ้น ช่วยเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของฟาจ C22 ในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง

เมื่อมีการสังเกตผลการทดลองที่ได้จากหัวข้อ 4.1 สภาวะที่มีการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารคงประสิทธิภาพ พบการผันผวนของความเข้มข้นฟาจคงเหลือเล็กน้อย ภายหลังจากจัดเก็บฟาจ 15 30 และ 45 วัน น่าจะเกิดจากอิทธิพลของการทดสอบด้วยพลาสติกที่จำเป็นต้องอาศัยการติดเชื้อของฟาจ

อย่างสมบูรณ์จึงจะเกิดคราบพลาค ส่งผลให้การคำนวณออกมาเป็นความเข้มข้นฟาจคงเหลือมีความผันผวนเล็กน้อย โดยพบค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 6.4%

นอกจากนี้เมื่อมีการนำผลการทดลองที่ได้จากหัวข้อ 4.2 และ 4.5 มาเปรียบเทียบกับจะพบความต่างของผลการทดลองเล็กน้อยในผลของการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลสต่อความเข้มข้นของฟาจ C22 โดยผลที่ได้จากหัวข้อ 4.2 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลสสูงขึ้น ส่งผลดีต่อการรักษาความเสถียรของฟาจ C22 ขณะที่ผลที่ได้จากหัวข้อ 4.5 พบแนวโน้มการสูญเสียความเข้มข้นของฟาจ C22 เมื่อความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลสสูงขึ้น ความแตกต่างของผลลัพธ์ที่ได้ น่าจะเกิดจากสภาวะการทดลองต่างกัน ดังนี้

1. การใช้สารคืนความชุ่มชื้นต่างกัน ในหัวข้อ 4.2 มีการใช้น้ำปราศจากไอออน ขณะที่หัวข้อ 4.5 มีการนำบัฟเฟอร์ MES เข้ามาใช้เป็นสารคืนความชุ่มชื้น โดยอิทธิพลของการใช้สารคืนความชุ่มชื้นต่างกัน น่าจะส่งผลต่ออันตรกิริยาระหว่างแคปซิดกับสารคืนความชุ่มชื้น ส่งผลให้ความสามารถในการคืนสภาพธรรมชาติของฟาจ C22 ต่างกัน
2. อุณหภูมิสำหรับการจัดเก็บตัวอย่างฟาจต่างกัน ในหัวข้อ 4.2 มีการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C ขณะที่หัวข้อ 4.5 มีการจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C โดยอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการจัดเก็บตัวอย่างฟาจ อาจส่งผลต่ออันตรกิริยาระหว่างแคปซิดกับซูโครสหรือทรีฮาโลส

อิทธิพลของคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical property) และความไวต่อสภาพแวดล้อมภายนอกของฟาจ C22 ทำให้ความต่างของสภาวะการทดลองเพียงเล็กน้อย ส่งผลต่อพฤติกรรมของฟาจ C22 เช่น พฤติกรรมการเกิดรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ที่ช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของฟาจ อาจปรับเปลี่ยนไป จึงทำให้ผลการทดลองมีความต่างกัน เมื่อสภาวะการทดลองเปลี่ยนไป

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาศารคองประสิทธิภาพสำหรับการคงสภาพฟาจ C22 โดยการใช้กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส และแมนนิทอลเป็นสารคองประสิทธิภาพ การทดสอบประสิทธิภาพของสารคองประสิทธิภาพสำหรับการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในรูปแบบสารละลายเป็นระยะเวลาทั้งหมด 45 วัน เพื่อคัดเลือกสารคองประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อฟาจ C22 เข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง พบว่าสารคองประสิทธิภาพที่ส่งผลดีและมีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือ ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M มีความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือมากกว่า 60% ภายหลังจากจึงมีการนำกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งเข้ามาใช้ร่วมกับการซูโครส ทรีฮาโลส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 M ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารคองประสิทธิภาพสำหรับการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในรูปแบบแห้งเป็นระยะเวลาทั้งหมด 90 วัน พบว่าสารคองประสิทธิภาพที่ส่งผลดีและมีประสิทธิภาพในการรักษาความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือ ได้แก่ ซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.5 M และทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 M มีความเข้มข้นฟาจคงเหลือมากกว่า 45%

ผลการศึกษากาวิเคราะห์โครงสร้าง และอิทธิพลของสารคองประสิทธิภาพที่ส่งผลต่อระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) พบว่าสารคองประสิทธิภาพที่มีความสามารถในการรักษาสภาพธรรมชาติ และโครงสร้างฟาจ C22 ผ่านการส่งเสริมพฤติกรรมรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ได้แก่ ซูโครส และทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M สามารถสังเกตระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง (ประมาณ 60-67%) และเกณฑ์สูง (ประมาณ 7-15%) ขณะที่การใช้แมนนิทอลเป็นสารคองประสิทธิภาพ พบว่าแมนนิทอลไม่ส่งเสริมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 และทำลายโครงสร้างฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง ทำให้ฟาจสูญเสียโครงสร้าง และสภาพธรรมชาติ สามารถสังเกตระดับการรวมกลุ่มกันของอนุภาคฟาจ C22 ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ต่ำ (มากกว่า 80%) ดังนั้นพฤติกรรมการรวมกลุ่มกันของฟาจ C22 ระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง น่าจะเป็นกลไกช่วยฟาจ C22 มีโอกาสรอดชีวิตมากขึ้น ผลการทดลองในฟาจ C22 สอดคล้องกับการศึกษาของฟาจ T4 ที่พบว่าการรวมกลุ่มกันของฟาจ T4 ช่วยปกป้องฟาจ T4 จากสภาพแวดล้อมรุนแรงที่สามารถทำลายฟาจ

ผลการศึกษากาประยุกต์ใช้วิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ปัจจัย (Factor) ต่อปัจจัยตอบสนอง (Response) และสถานะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้ง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบแช่แข็งฟาจ C22 พบว่าปัจจัยที่มีนัยสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ได้แก่ ปัจจัยความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) ปัจจัยความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและทรีฮาโลส ($A*B$) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของซูโครสและความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ ($A*C$) ปัจจัยร่วมของความเข้มข้นของทรีฮาโลสและปริมาตรของฟาจ ($B*D$) และ ปัจจัยร่วมของความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์และปริมาตรของฟาจ ($C*D$) โดยการวิเคราะห์ ผลกระทบของปัจจัยอิทธิพลหลัก พบว่าปัจจัยความเข้มข้นของซูโครส (A) ความเข้มข้นของ ทรีฮาโลส (B) และปริมาตรของฟาจ (D) ส่งผลทางด้านลบต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ ขณะที่ปัจจัย ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) ส่งผลทางด้านบวกต่อความเข้มข้นฟาจคงเหลือ และสภาวะที่ เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 ประกอบด้วยความเข้มข้นของซูโครส (A) เท่ากับ 0.48 M ความเข้มข้นของทรีฮาโลส (B) เท่ากับ 0.27 M ความแข็งแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (C) เท่ากับ 0.24 M และปริมาตรของฟาจ (D) เท่ากับ 300 ไมโครลิตร ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นฟาจคง เหลือสูงสุด 100%

การศึกษากระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจในอนาคต ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ คุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical property) ของฟาจ และปัจจัยอื่นที่น่าจะมีความสำคัญต่อกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เช่น ความชื้น ศักย์ซีตาของอนุภาค (Zeta potential) และความเร็วในการคืนความชุ่มชื้นแก่ฟาจ (Rehydration) เพื่อสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับกลไก พฤติกรรม และความสัมพันธ์ระหว่างสารคงประสิทธิภาพและฟาจในการรักษาสภาพฟาจจาก สภาพแวดล้อมที่รุนแรง นอกจากนี้วิธีการใช้ฟาจแบบผสม (Phage cocktail) มีความน่าสนใจและ ควรได้รับการศึกษา เนื่องจากฟาจมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรีย การประยุกต์ใช้ฟาจแบบ ผสมน่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเชื้อและหลากหลายสายพันธุ์มากขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะสำหรับการปรับปรุงวิธีการทดลองของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเพื่อหา สูตรที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 เนื่องจากค่า Lack-of-fit ของโมเดล ตามตารางที่ 4.2 มีค่าน้อยกว่า 0.05 ส่งผลให้โมเดลยังไม่สามารถนำมาทำนายผลลัพธ์ที่ได้จาก กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งฟาจ C22 มีดังนี้

1. เพิ่มจำนวนการทดลองซ้ำ จำนวนการทดลองที่มากขึ้นช่วยเพิ่มความแม่นยำและลดความ แปรปรวนของข้อมูลที่เกิดจากธรรมชาติของวิธีการทดสอบด้วยฟาจและธรรมชาติของ ฟาจ นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนการทดลองซ้ำ สามารถลดอิทธิพลจากความผิดพลาดที่เกิด จากมนุษย์และช่วยเพิ่มค่า Lack-of-fit เพื่อให้โมเดลสามารถทำนายความเข้มข้นฟาจคง เหลืออย่างแม่นยำมากขึ้น

2. ใช้เทคนิคอื่นร่วมกับวิธีการทดสอบด้วยพลาค เช่น การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาผ่านการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมหรือการศึกษาความเป็นผลึกผ่านเทคนิควิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) เพื่อยืนยันผลการทดลองและเพิ่มมุมมองในการสรุปผลการทดลอง

ข้อเสนอแนะทั้งสองข้อถูกนำเสนอเพื่อลดอิทธิพลที่อาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองที่เกิดจากวิธีการทดสอบด้วยพลาค และธรรมชาติของฟาจซึ่งสามารถอธิบายสาเหตุ ดังนี้

1. ปัจจัยที่เกิดจากธรรมชาติของวิธีการทดสอบด้วยพลาค โดยวิธีการทดสอบด้วยพลาคเป็นวิธีที่อาศัยการนับพลาคจากการที่ฟาจติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่สามารถรบกวนขั้นตอนการเกิดพลาค เช่น อุณหภูมิ การยึดเกาะของฟาจกับเซลล์เจ้าบ้าน (Phage adsorption) เวลาสำหรับการยึดเกาะแบคทีเรียของฟาจ และกระบวนการติดเชื้อของฟาจในแบคทีเรีย เป็นต้น ทำให้ความแตกต่างของขั้นตอนการทดลองเพียงเล็กน้อยในขั้นตอนของวิธีการทดสอบด้วยพลาค อาจส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นและความเสถียรของฟาจ
2. ปัจจัยที่เกิดจากธรรมชาติของฟาจ โดยองค์ประกอบหลักของฟาจ ประกอบด้วยเปลือกหุ้ม โปรตีนและสารพันธุกรรม ซึ่งมีความไวต่อสภาพแวดล้อม ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับฟาจควรทำอย่างละเอียด และแม่นยำ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในขั้นตอนการทดลองเพียงเล็กน้อย อาจส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นของฟาจอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นการเพิ่มจำนวนการทดลองซ้ำ เพื่อช่วยลดผลกระทบที่เกิดจากความแปรปรวนของข้อมูล และการใช้เทคนิคอื่นร่วมกับวิธีการทดสอบด้วยพลาค จึงเป็นสิ่งที่ควรทำ

บรรณานุกรม

- [1] J. Mansfield *et al.*, “Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology,” *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, no. 6, pp. 614–629, Aug. 2012, doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- [2] T. P. Mamphogoro, O. O. Babalola, and O. A. Aiyegoro, “Sustainable management strategies for bacterial wilt of sweet peppers (*Capsicum annum*) and other Solanaceous crops,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 129, no. 3, pp. 496–508, Sep. 2020, doi: 10.1111/jam.14653.
- [3] Q. Cai *et al.*, “Study on the relationship between bacterial wilt and rhizospheric microbial diversity of flue-cured tobacco cultivars,” *European Journal of Plant Pathology*, vol. 160, no. 2, pp. 265–276, Jun. 2021, doi: 10.1007/s10658-021-02237-4.
- [4] W. Ahmed *et al.*, “*Ralstonia solanacearum*, a deadly pathogen: Revisiting the bacterial wilt biocontrol practices in tobacco and other Solanaceae,” *Rhizosphere*, vol. 21, p. 100479, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.rhisph.2022.100479.
- [5] Yuliär, Y. A. Nion, and K. Toyota, “Recent Trends in Control Methods for Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*,” *Microbes and environments*, vol. 30, no. 1, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1264/jsme2.ME14144.
- [6] T. Denny, “Plant pathogenic *Ralstonia* species,” in *Plant-Associated Bacteria*, vol. 9781402045, Dordrecht: Springer Netherlands, 2006, pp. 573–644.
- [7] A. M. Khairy, M. R. A. Tohamy, M. A. Zayed, and M. A. S. Ali, “Detecting pathogenic bacterial wilt disease of potato using biochemical markers and evaluate resistant in some cultivars,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, no. 9, pp. 5193–5203, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2021.05.045.
- [8] Y. Wang *et al.*, “A bacterial effector protein uncovers a plant metabolic pathway involved in tolerance to bacterial wilt disease,” *Molecular Plant*, vol. 14, no. 8, pp. 1281–1296, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.molp.2021.04.014.

[9] F. Meng, “*Ralstonia Solanacearum* Species Complex and Bacterial Wilt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Disease,” *Journal of Bacteriology & Parasitology*, vol. 04, no. 02, 2013, doi: 10.4172/2155-9597.1000e119.
- [10] H. Xue, R. Lozano-Durán, and A. P. Macho, “Insights into the Root Invasion by the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*,” *Plants*, vol. 9, no. 4, p. 516, Apr. 2020, doi: 10.3390/plants9040516.
- [11] G. Jiang *et al.*, “Bacterial Wilt in China: History, Current Status, and Future Perspectives,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 8, Sep. 2017, doi: 10.3389/fpls.2017.01549.
- [12] J. B. Jones *et al.*, “Considerations for using bacteriophages for plant disease control,” *Bacteriophage*, vol. 2, no. 4, p. e23857, Oct. 2012, doi: 10.4161/bact.23857.
- [13] J. B. Jones, L. E. Jackson, B. Balogh, A. Obradovic, F. B. Iriarte, and M. T. Momol, “Bacteriophages for Plant Disease Control,” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 45, no. 1, pp. 245–262, Sep. 2007, doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411.
- [14] R. L. Dy, L. A. Rigano, and P. C. Fineran, “Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 46, no. 6, pp. 1605–1613, Dec. 2018, doi: 10.1042/BST20180178.
- [15] E. Jończyk, M. Kłak, R. Międzybrodzki, and A. Górski, “The influence of external factors on bacteriophages—review,” *Folia Microbiologica*, vol. 56, no. 3, pp. 191–200, May 2011, doi: 10.1007/s12223-011-0039-8.
- [16] E. Jończyk-Matysiak *et al.*, “Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application,” *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol. 17, no. 8, pp. 583–606, Aug. 2019, doi: 10.1080/14787210.2019.1646126.
- [17] P. Manohar and N. Ramesh, “Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 15242, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-51742-4.

- [18] S. Ohtake, Y. Kita, and T. Arakawa, "Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 13, pp. 1053–1073, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.addr.2011.06.011.
- [19] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, and H. Fessi, "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 15, pp. 1688–1713, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.017.
- [20] W. Wang, "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 203, no. 1–2, pp. 1–60, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0378-5173(00)00423-3.
- [21] U. Puapermpoonsiri, S. J. Ford, and C. F. van der Walle, "Stabilization of bacteriophage during freeze drying," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 389, no. 1–2, pp. 168–175, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.01.034.
- [22] M. Merabishvili *et al.*, "Stability of Staphylococcus aureus Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization)," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, p. e68797, Jul. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068797.
- [23] A. Bhunchoth *et al.*, "Isolation of Ralstonia solanacearum-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 118, no. 4, pp. 1023–1033, 2015, doi: 10.1111/jam.12763.
- [24] U. Sae-Ueng *et al.*, "C22 podovirus infectivity is associated with intermediate stiffness," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 12604, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69409-w.
- [25] C. Li *et al.*, "Biochar suppresses bacterial wilt disease of flue-cured tobacco by improving soil health and functional diversity of rhizosphere microorganisms," *Applied Soil Ecology*, vol. 171, p. 104314, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.apsoil.2021.104314.
- [26] A. Namisy, J. R. Chen, J. Prohens, E. Metwally, M. Elmahrouk, and M. Rakha, "Screening cultivated eggplant and wild relatives for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*)," *Agriculture (Switzerland)*, vol. 9, no. 7, p. 157,

- Jul. 2019, doi: 10.3390/agriculture9070157.
- [27] T. B. Adhikari and R. C. Basnyat, “Effect of crop rotation and cultivar resistance on bacterial wilt of tomato in Nepal,” *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 20, no. 3, pp. 283–287, Dec. 1998, doi: 10.1080/07060669809500394.
- [28] G. Ayana and C. Fininsa, “Effect of Crop Rotation on Tomato Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) and Survival of the Pathogen in the Rhizospheres and Roots of Different Crops in Ethiopia,” *International Journal of Phytopathology*, vol. 5, no. 3, pp. 81–88, 2017, doi: 10.33687/phytopath.005.03.1932.
- [29] W. C. Lin *et al.*, “Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases,” *Transgenic Research*, vol. 13, no. 6, pp. 567–581, Dec. 2004, doi: 10.1007/s11248-004-2375-9.
- [30] H. Yamazaki and T. Hoshina, “Calcium Nutrition Affects Resistance of Tomato Seedlings to Bacterial Wilt,” *HortScience*, vol. 30, no. 1, pp. 91–93, Feb. 1995, doi: 10.21273/HORTSCI.30.1.91.
- [31] B. M. Santos, J. P. Gilreath, T. N. Motis, J. W. Noling, J. P. Jones, and J. A. Norton, “Comparing methyl bromide alternatives for soilborne disease, nematode and weed management in fresh market tomato,” *Crop Protection*, vol. 25, no. 7, pp. 690–695, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.cropro.2005.09.015.
- [32] D. Singh, D. K. Yadav, S. Sinha, and H. Singh, “Effect of safe chemicals and bleaching powder on bacterial wilt incidence in Tomato caused by *Ralstonia solanacearum* race 1 bv. 3,” 2012.
- [33] B. Álvarez, M. M. López, and E. G. Biosca, “Influence of Native Microbiota on Survival of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II in River Water Microcosms,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 22, pp. 7210–7217, Nov. 2007, doi: 10.1128/AEM.00960-07.
- [34] T. Yamada, T. Kawasaki, S. Nagata, A. Fujiwara, S. Usami, and M. Fujie, “New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*,” *Microbiology*, vol. 153, no. 8, pp. 2630–2639, Aug. 2007, doi:

10.1099/mic.0.2006/001453-0.

- [35] Z. Dong *et al.*, “Isolation and characterization of a novel phage Xoo-sp2 that infects *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,” *Journal of General Virology*, vol. 99, no. 10, pp. 1453–1462, Oct. 2018, doi: 10.1099/jgv.0.001133.
- [36] K. Gašić, N. Kuzmanović, M. Ivanović, A. Prokić, M. Šević, and A. Obradović, “Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, no. AUG, p. 2021, Aug. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02021.
- [37] G. Tortora, B. Funke, and C. Case, *Microbiology: An Introduction*, 13th ed. 2019.
- [38] M. R. J. Clokie, A. D. Millard, A. V. Letarov, and S. Heaphy, “Phages in nature,” *Bacteriophage*, vol. 1, no. 1, pp. 31–45, Jan. 2011, doi: 10.4161/bact.1.1.14942.
- [39] Y. Zhang, H. Zhang, and D. Ghosh, “The Stabilizing Excipients in Dry State Therapeutic Phage Formulations,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 21, no. 4, p. 133, May 2020, doi: 10.1208/s12249-020-01673-5.
- [40] M. Jamal *et al.*, “Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields,” *Journal of Basic Microbiology*, vol. 59, no. 2, pp. 123–133, Feb. 2019, doi: 10.1002/jobm.201800412.
- [41] H.-W. Ackermann, “5500 Phages examined in the electron microscope,” *Archives of Virology*, vol. 152, no. 2, pp. 227–243, Feb. 2007, doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.
- [42] H.-W. Ackermann, “Bacteriophage observations and evolution,” *Research in Microbiology*, vol. 154, no. 4, pp. 245–251, May 2003, doi: 10.1016/S0923-2508(03)00067-6.
- [43] F. L. Nobrega *et al.*, “Targeting mechanisms of tailed bacteriophages,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, no. 12, pp. 760–773, 2018, doi: 10.1038/s41579-018-0070-8.
- [44] S. J. Labrie, J. E. Samson, and S. Moineau, “Bacteriophage resistance mechanisms,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 5, pp. 317–327, 2010,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

doi: 10.1038/nrmicro2315.

- [45] S. Sharma *et al.*, “Bacteriophages and its applications: an overview,” *Folia Microbiologica*, vol. 62, no. 1. pp. 17–55, 2017, doi: 10.1007/s12223-016-0471-x.
- [46] C. D. Jepson and J. B. March, “Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle,” in *Vaccine*, 2004, vol. 22, no. 19, pp. 2413–2419, doi: 10.1016/j.vaccine.2003.11.065.
- [47] R. A. Govenal and C. P. Gerba, “Removal of MS-2 and PRD-1 bacteriophages from an ultrapure water system,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 3, pp. 166–172, 1999, doi: 10.1038/sj.jim.2900711.
- [48] P. Haseley and G.-W. Oetjen, *Freeze-Drying*, 3rd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018.
- [49] P. Matejtschuk, “Lyophilization of proteins.,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 368, no. 4, pp. 59–72, 2007, doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_4.
- [50] D. Nowak and E. Jakubczyk, “The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials,” *Foods*, vol. 9, no. 10, p. 1488, Oct. 2020, doi: 10.3390/foods9101488.
- [51] F. Franks, “Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 45, no. 3, pp. 221–229, May 1998, doi: 10.1016/S0939-6411(98)00004-6.
- [52] T. A. Jennings, *Lyophilization*, 1st ed. CRC Press, 1999.
- [53] F. Engelmann and S. Dussert, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, vol. 368. Totowa, NJ: Humana Press, 2007.
- [54] A. Molnar *et al.*, “Lyophilization and homogenization of biological samples improves reproducibility and reduces standard deviation in molecular biology techniques,” *Amino acids*, vol. 53, no. 6, pp. 917–928, Jun. 2021, doi: 10.1007/s00726-021-02994-w.

[55] S. L. Nail, S. Jiang, S. Chongprasert, and S. A. Knopp, “Fundamentals of Freeze-
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้เอาต์เห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Drying,” in *Pharmaceutical biotechnology*, vol. 14, no. Chapter 6, 2002, pp. 281–360.
- [56] K.-I. Izutsu, “Stabilization of therapeutic proteins in aqueous solutions and freeze-dried solids: an overview.,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1129, pp. 435–41, 2014, doi: 10.1007/978-1-62703-977-2_31.
- [57] Y. Zhang, X. Peng, H. Zhang, A. B. Watts, and D. Ghosh, “Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 542, no. 1–2, pp. 1–7, May 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.023.
- [58] D. J. Malik *et al.*, “Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy.,” *Advances in colloid and interface science*, vol. 249, no. May, pp. 100–133, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
- [59] C. Stylianopoulos, “Carbohydrates: Regulation of Metabolism,” *Encyclopedia of Human Nutrition*, vol. 1–4. pp. 272–277, 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-375083-9.00042-8.
- [60] J. N. BeMiller, “Monosaccharides,” in *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, Elsevier, 2019, pp. 1–23.
- [61] E. M. Yahia, A. Carrillo-López, and L. A. Bello-Perez, “Carbohydrates,” in *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Elsevier, 2019, pp. 175–205.
- [62] “D-(+)-Glucose =99.5 GC 50-99-7.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sigma/g8270>. [Accessed: 23-Apr-2023].
- [63] C. A. Williams, “GALACTOSE,” in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Elsevier, 2003, pp. 2843–2846.
- [64] “D-(+)-Galactose =99 59-23-4.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sial/g0750>. [Accessed: 23-Apr-2023].

[65] V. Stiger-Pouvreau, N. Bourgougnon, and E. Deslandes, “Carbohydrates From

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Seaweeds,” in *Seaweed in Health and Disease Prevention*, Elsevier, 2016, pp. 223–274.
- [66] S. G. Pallardy, “Carbohydrates,” in *Physiology of Woody Plants*, Elsevier, 2008, pp. 199–215.
- [67] J. N. BeMiller, *Carbohydrate chemistry for food scientists*. 2018.
- [68] “Sucrose = 99.5 57-50-1.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sigma/s8501>. [Accessed: 23-Apr-2023].
- [69] Y. Xu *et al.*, “Sustainable bioproduction of natural sugar substitutes: Strategies and challenges,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 129. pp. 512–527, 2022, doi: 10.1016/j.tifs.2022.11.008.
- [70] A. Saraiva, C. Carrascosa, D. Raheem, F. Ramos, and A. Raposo, “Natural Sweeteners: The Relevance of Food Naturalness for Consumers, Food Security Aspects, Sustainability and Health Impacts.,” *International journal of environmental research and public health*, vol. 17, no. 17, pp. 1–22, Aug. 2020, doi: 10.3390/ijerph17176285.
- [71] “D -(+)-Trehalose for microbiology, = 99.0 6138-23-4.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sial/90210>. [Accessed: 23-Apr-2023].
- [72] “D-Lactose monohydrate - β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc, 4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-glucose.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/substance/dlactosemonohydrate3603164044515>. [Accessed: 23-Apr-2023].
- [73] M. Grembecka, “Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review,” *European Food Research and Technology*, vol. 241, no. 1, pp. 15–16, Jul. 2015, doi: 10.1007/s00217-015-2458-2.
- [74] M. Grembecka, “Sugar Alcohols,” in *Encyclopedia of Food Chemistry*, Elsevier, 2019, pp. 265–275.
- [75] “D-Mannitol =98 69-65-8.” [Online]. Available:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sial/m4125>. [Accessed: 23-Apr-2023].

- [76] P. Manohar, A. J. Tamhankar, C. S. Lundborg, and N. Ramesh, "Isolation, characterization and in vivo efficacy of Escherichia phage myPSH1131," *PLOS ONE*, vol. 13, no. 10, p. e0206278, Oct. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0206278.
- [77] T. Qin, Q. Ma, H. Chen, and G. Shu, "Effect of four materials including trehalose, soluble starch, raffinose and galactose on survival of Lactobacillus acidophilus during freeze-drying," *Advanced Materials Research*, vol. 700. pp. 259–262, 2013, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.700.259.
- [78] C. Dini and P. J. de Urraza, "Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage," *Cryobiology*, vol. 66, no. 3, pp. 339–342, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.03.007.
- [79] E. González-Menéndez, L. Fernández, D. Gutiérrez, A. Rodríguez, B. Martínez, and P. García, "Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of Staphylococcus phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products.," *PloS one*, vol. 13, no. 10, p. e0205728, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0205728.
- [80] S. K. Singh, "Sucrose and Trehalose in Therapeutic Protein Formulations," in *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, vol. 38, Springer International Publishing, 2018, pp. 63–95.
- [81] D. Vandenheuvél, A. Singh, K. Vandersteegen, J. Klumpp, R. Lavigne, and G. Van den Mooter, "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 84, no. 3, pp. 578–582, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ejpb.2012.12.022.
- [82] L. Golshahi, K. H. Lynch, J. J. Dennis, and W. H. Finlay, "In vitro lung delivery of bacteriophages KS4-M and Φ KZ using dry powder inhalers for treatment of Burkholderia cepacia complex and Pseudomonas aeruginosa infections in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- cystic fibrosis,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 110, no. 1, pp. 106–117, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04863.x.
- [83] R. Y. Chang *et al.*, “Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 121, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1016/j.ejpb.2017.09.002.
- [84] S. S. Y. Leung *et al.*, “Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 521, no. 1–2, pp. 141–149, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.060.
- [85] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 9th ed. 2017.
- [86] J. R. Wagner, E. M. Mount, and H. F. Giles, “Design of Experiments,” in *Extrusion*, Elsevier, 2014, pp. 291–308.
- [87] S. L. C. Ferreira *et al.*, “Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 597, no. 2, pp. 179–186, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011.
- [88] C. Yang *et al.*, “Optimizing the Chemical Compositions of Protective Agents for Freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 20, no. 5, pp. 930–936, Oct. 2012, doi: 10.1016/S1004-9541(12)60420-0.
- [89] H. Velly, F. Fonseca, S. Passot, A. Delacroix-Buchet, and M. Bouix, “Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 117, no. 3, pp. 729–740, 2014, doi: 10.1111/jam.12577.
- [90] G. Shu, B. Zhang, Y. Hui, H. Chen, and H. Wan, “Optimization of cryoprotectants for *Streptococcus thermophilus* during freeze-drying using Box-Behnken experimental design of response surface methodology,” *Emirates Journal of Food and Agriculture*, vol. 29, no. 4, pp. 256–263, 2017, doi: 10.9755/ejfa.2016-07-960.

- [91] F. Ergin, Z. Atamer, E. M. Comak Göcer, M. Demir, J. Hinrichs, and A. Kucukcetin, “Optimization of Salmonella bacteriophage microencapsulation in alginate-caseinate formulation using vibrational nozzle technique,” *Food Hydrocolloids*, vol. 113, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106456.
- [92] H. S. Nasran, H. M. Yusof, M. Halim, and N. A. Rahman, “Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide,” *Molecules*, vol. 25, no. 11, 2020, doi: 10.3390/molecules25112618.
- [93] A. Baer and K. Kehn-Hall, “Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 93, p. 52065, Nov. 2014, doi: 10.3791/52065.
- [94] S. Vahabi, B. Nazemi Salman, and A. Javanmard, “Atomic force microscopy application in biological research: a review study,” *Iranian journal of medical sciences*, vol. 38, no. 2, pp. 76–83, Jun. 2013.
- [95] Y. F. Dufrène *et al.*, “Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology,” *Nature Nanotechnology*, vol. 12, no. 4, pp. 295–307, 2017, doi: 10.1038/nnano.2017.45.
- [96] Y. F. Dufrène, “Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 9, pp. 674–680, 2008, doi: 10.1038/nrmicro1948.
- [97] X. Deng *et al.*, “Application of atomic force microscopy in cancer research,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, p. V, 2018, doi: 10.1186/s12951-018-0428-0.
- [98] A. Simperler *et al.*, “Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: An experimental and in silico study,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 39, pp. 19678–19684, 2006, doi: 10.1021/jp063134t.
- [99] V. Gervasi, R. Dall Agnol, S. Cullen, T. McCoy, S. Vucen, and A. Crean, “Parenteral protein formulations: An overview of approved products within the European Union,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 131, pp. 8–24, Oct. 2018, doi:

10.1016/j.ejpb.2018.07.011.

[100] M. J. Akers, “Excipient-drug interactions in parenteral formulations,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 91, no. 11, pp. 2283–2300, 2002, doi: 10.1002/jps.10154.

[101] H. Steckel and N. Bolzen, “Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 270, no. 1–2, pp. 297–306, 2004, doi: 10.1016/j.ijpharm.2003.10.039.

[102] B. Szermer-Olearnik *et al.*, “Aggregation/dispersion transitions of T4 phage triggered by environmental ion availability,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1186/s12951-017-0266-5.

[103] H. R. Costantino, S. P. Schwendeman, R. Langer, and A. M. Klivanov, “Deterioration of lyophilized pharmaceutical proteins,” *Biochemistry*, vol. 63, no. 3, pp. 357–63, Mar. 1998.

[104] J. F. Carpenter, B. S. Chang, W. Garzon-Rodriguez, and T. W. Randolph, “Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice,” in *Pharmaceutical biotechnology*, vol. 13, Springer US, 2002, pp. 109–133.

[105] D. S. Goldberg, S. M. Bishop, A. U. Shah, and H. A. Sathish, “Formulation development of therapeutic monoclonal antibodies using high-throughput fluorescence and static light scattering techniques: Role of conformational and colloidal stability,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, no. 4, pp. 1306–1315, 2011, doi: 10.1002/jps.22371.

[106] T. J. Kamerzell, R. Esfandiary, S. B. Joshi, C. R. Middaugh, and D. B. Volkin, “Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 13, pp. 1118–1159, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.addr.2011.07.006.

[107] V. M. Lavenburg, Y.-T. Liao, A. Salvador, A. L. Hsu, L. A. Harden, and V. C. H. Wu, “Effects of lyophilization on the stability of bacteriophages against different serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*,” *Cryobiology*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- vol. 96, no. August, pp. 85–91, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.07.012.
- [108] J. Langlet, F. Gaboriaud, and C. Gantzer, “Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, no. 5, pp. 1632–1638, Nov. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03396.x.
- [109] E. Stone, K. Campbell, I. Grant, and O. McAuliffe, “Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions,” *Viruses*, vol. 11, no. 6, p. 567, Jun. 2019, doi: 10.3390/v11060567.
- [110] “Analysis of Variance table for One-Way ANOVA - Minitab.” [Online]. Available: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/how-to/one-way-anova/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/analysis-of-variance-table/>. [Accessed: 02-May-2023].
- [111] “Residual plots in Minitab - Minitab.” [Online]. Available: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/regression/supporting-topics/residuals-and-residual-plots/residual-plots-in-minitab/>. [Accessed: 02-May-2023].
- [112] “Effects plots for Analyze Factorial Design - Minitab.” [Online]. Available: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/>. [Accessed: 02-May-2023].
- [113] “5.5.9.8. Half-normal probability plot.” [Online]. Available: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri598.htm>. [Accessed: 02-May-2023].
- [114] “Interpret the key results for Main Effects Plot - Minitab.” [Online]. Available: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/how-to/main-effects-plot/interpret-the-results/key-results/>. [Accessed: 02-May-2023].
- [115] “Interpret the key results for Interaction Plot - Minitab.” [Online]. Available: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/how-to/interaction-plot/interpret-the-results/key-results/>.

[Accessed: 02-May-2023].

- [116] “Interpret the key results for Contour Plot - Minitab.” [Online]. Available: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/20/help-and-how-to/graphs/contour-plot/key-results/>. [Accessed: 02-May-2023].
- [117] N. Sultana *et al.*, “Experimental study and parameters optimization of microalgae based heavy metals removal process using a hybrid response surface methodology-crow search algorithm,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 15068, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72236-8.
- [118] S. Ohtake and Y. J. Wang, “Trehalose: Current use and future applications,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, no. 6. Elsevier, pp. 2020–2053, 01-Jun-2011, doi: 10.1002/jps.22458.
- [119] A. Furiga *et al.*, “Effects of ionic strength on bacteriophage MS2 behavior and their implications for the assessment of virus retention by ultrafiltration membranes,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 1, pp. 229–236, 2011, doi: 10.1128/AEM.01075-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สารเคมี

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตาราง ก.1 ส่วนประกอบของอาหารเหลว CPG (CPG media)

ส่วนประกอบของอาหารเหลว CPG	น้ำกลั่น 1 L
กรดเคซามิโน (Casamino acids) 0.1%(w/v)	1 g
เปปโตน (Peptone) 1%(w/v)	10 g
กลูโคส (Glucose) 0.5%(w/v)	5 g

ตาราง ก.2 ส่วนประกอบของอาหารวุ้นอ่อน CPG (CPG top agar)

ส่วนประกอบของอาหารวุ้นอ่อน CPG	อาหารวุ้นอ่อน CPG 0.3 L
น้ำกลั่น 1 ส่วน	100 ml
อาหารเหลว CPG 2 ส่วน	200 ml
ผงวุ้น 0.45%(w/v)	4.5 g

ตาราง ก.3 ส่วนประกอบของอาหารวุ้นแข็ง CPG (CPG agar)

ส่วนประกอบของอาหารวุ้นแข็ง CPG	อาหารวุ้นแข็ง 1 L
อาหารเหลว CPG	1000 ml
ผงวุ้น 1.5%(w/v)	15 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES

ตาราง ก.4 ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.04 M (IS=0.04)

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.04 M	ความเข้มข้น
สารละลาย MES (pH = 6.0)	0.05 M
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0 M
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄)	0.01 M

ตาราง ก.5 ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.14 M (IS=0.14)

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.14 M	ความเข้มข้น
สารละลาย MES (pH = 6.0)	0.05 M
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	0.1 M
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate)	0.01 M

ตาราง ก.6 ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.24 M (IS=0.24)

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ MES ความแข็งแรงไอออนเท่ากับ 0.24 M	ความเข้มข้น
สารละลาย MES (pH = 6.0)	0.05 M
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	0.2 M
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate)	0.01 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง ก.7 เกรดและบริษัทของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	เกรด	บริษัท
กลูโคส (Glucose)	HPLC	MilliporeSigma
กาแลคโตส (Galactose)	HPLC	MilliporeSigma
ซูโครส (Sucrose)	HPLC	MilliporeSigma
ทรีฮาโลส (Trehalose)	HPLC	MilliporeSigma
แลคโตส (Lactose)	HPLC	MilliporeSigma
แมนนิทอล (Mannitol)	HPLC	MilliporeSigma
กรดเคซามิโน (Casamino acids)	-	BD Biosciences
เปปโตน (Peptone)	-	HiMedia
วุ้น (Agar)	-	วุ้นบริสุทธิ์ จำกัด
2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	-	Sigma-Aldrich
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	-	Carlo Erba
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate)	-	MilliporeSigma
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	-	Sigma-Aldrich
Deoxyribonuclease I (DNase I)	-	Roche
Ribonuclease A (RNase A)	-	Sigma-Aldrich
แผ่นไมกา (Mica)	V1	Ted Pella
(3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTS)	-	Sigma-Aldrich

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติทั่วไปของสารคงประสิทธิภาพ

ตาราง ก.8 มวลโมเลกุล ความสามารถในการละลายน้ำ และอุณหภูมิสภาพแก้วของสารคงประสิทธิภาพ [20]

สารคงประสิทธิภาพ	มวลโมเลกุล	ความสามารถในการละลาย ที่อุณหภูมิ 20 °C	อุณหภูมิสภาพแก้ว
กลูโคส	180.16 g/mol	470 g/L	32 °C
กาแลคโตส	180.16 g/mol	180 g/L	31 °C
ซูโครส	342.30 g/mol	500 g/L	75 °C
ทรีฮาโลส	378.33 g/mol	ละลายได้อย่างสมบูรณ์	118 °C
แลคโตส	360.31 g/mol	161 g/L	114 °C
แมนนิทอล	182.17 g/mol	182 g/L	13 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

ตาราง ข.1 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาล แอลกอฮอล์แต่ละสภาวะก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจ ทุกๆ 15 วันเป็นระยะเวลา 45 วัน โดยจะมีการปรับวันที่ 0 ให้มีค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือเท่ากับ 100% สำหรับการเปรียบเทียบและแถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

สภาวะ	0 วัน	15 วัน	30 วัน	45 วัน
No excipient	100.0 ± 5.2	83.0 ± 7.1	73.1 ± 3.3	68.3 ± 5.4
0.5 M Glucose	100.0 ± 4.8	62.7 ± 8.4	29.4 ± 4.4	27.5 ± 6.5
0.5 M Galactose	100.0 ± 1.9	63.0 ± 8.4	23.7 ± 3.9	20.5 ± 2.5
0.5 M Sucrose	100.0 ± 1.1	76.7 ± 4.6	71.3 ± 4.4	57.9 ± 1.8
0.5 M Trehalose	100.0 ± 2.9	91.8 ± 1.6	97.0 ± 6.4	93.3 ± 4.7
0.5 M Lactose	100.0 ± 5.7	63.9 ± 9.0	22.2 ± 1.1	2.2 ± 0.9
0.5 M Mannitol	100.0 ± 6.5	92.1 ± 3.0	90.0 ± 6.0	78.2 ± 5.3

ตาราง ข.2 การประยุกต์ใช้วิธีการทูคี-เครเมอร์สำหรับข้อมูลของแต่ละสภาวะสำหรับการจัดเก็บ ฟาจรูปแบบสารละลายระยะเวลา 45 วัน

ตัวแปร	ค่า (Value)
Number of conditions	7
Degree of freedom	6
F-value	48.6
P-value	3.23E-13

สภาวะ	กลุ่ม
0.5 M Trehalose	1
0.5 M Mannitol	1, 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะ	กลุ่ม
No excipient	2
0.5 M Sucrose	2
0.5 M Glucose	3
0.5 M Galactose	3, 4
0.5 M Lactose	4

ตาราง ข.3 ร้อยละความเข้มข้นฟาจ C22 คงเหลือสัมพัทธ์ในสารละลายน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์แต่ละสภาวะเทียบระหว่างก่อนและหลังการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยมีการทดสอบหาความเข้มข้นฟาจทุกๆ 30 วันเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยจะมีการปรับวันที่ 0 ให้มีค่าความเข้มข้นฟาจคงเหลือเท่ากับ 100% สำหรับการเปรียบเทียบและแถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

สภาวะ	ก่อนกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง	30 วัน	60 วัน	90 วัน
No excipient	100.0 ± 7.1	0.003 ± 0.001	< 0.0001	< 0.0001
0.1 M Sucrose	100.0 ± 7.7	70.7 ± 5.0	45.2 ± 6.1	27.2 ± 8.5
0.25 M Sucrose	100.0 ± 2.2	37.2 ± 8.3	30.4 ± 4.5	28.3 ± 4.1
0.5 M Sucrose	100.0 ± 1.2	82.1 ± 7.3	62.1 ± 2.3	45.0 ± 3.8
0.1 M Trehalose	100.0 ± 1.6	94.2 ± 8.8	63.4 ± 5.5	37.9 ± 3.4
0.25 M Trehalose	100.0 ± 4.6	95.1 ± 3.2	76.3 ± 4.7	58.8 ± 1.2
0.5 M Trehalose	100.0 ± 6.1	95.0 ± 4.7	76.0 ± 5.3	65.1 ± 5.5
0.1 M Mannitol	100.0 ± 5.8	0.03 ± 0.01	0.004 ± 0.0007	< 0.0001
0.25 M Mannitol	100.0 ± 6.2	0.06 ± 0.002	0.0008 ± 0.00004	< 0.0002
0.5 M Mannitol	100.0 ± 6.3	0.002 ± 0.0008	0.0002 ± 0.00006	< 0.0003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.4 การประยุกต์ใช้วิธีการทูคี-เครเมอร์สำหรับข้อมูลของแต่ละสภาวะสำหรับการจัดเก็บ
พาจรูปแบบแห้งระยะเวลา 90 วัน

ตัวแปร	ค่า (Value)
Number of conditions	10
Degree of freedom	9
F-value	212.36
P-value	2.84E-30

สภาวะ	กลุ่ม
0.25 M Trehalose	1
0.5 M Trehalose	1
0.1 M Trehalose	2
0.5 M Sucrose	2
0.1 M Sucrose	3
0.25 M Sucrose	3
0.1 M Mannitol	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.5 ร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 สำหรับการทดสอบ 4 สภาวะ แถบ Error bar แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) บ่งบอกถึงการเกิดความคลาดเคลื่อนจากการนับ (Counting error) ผ่านภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

สภาวะ	1 อนุภาค	2 – 4 อนุภาค	5 – 10 อนุภาค	11 – 20 อนุภาค	> 20 อนุภาค
C22 phage in MES buffer	82.98 ± 3.21	14.29 ± 1.33	2.11 ± 0.51	0.50 ± 0.25	0.12 ± 0.12
C22 phage in MES buffer with 0.5 M sucrose	25.13 ± 2.06	42.16 ± 2.67	24.79 ± 2.04	4.72 ± 0.89	3.20 ± 0.74
C22 phage in MES buffer with 0.5 M trehalose	24.92 ± 2.75	43.77 ± 3.65	16.72 ± 2.25	8.51 ± 1.61	6.08 ± 1.36
C22 phage in MES buffer with 0.5 M mannitol	85.03 ± 3.42	11.54 ± 1.26	2.34 ± 0.57	0.69 ± 0.31	0.41 ± 0.24

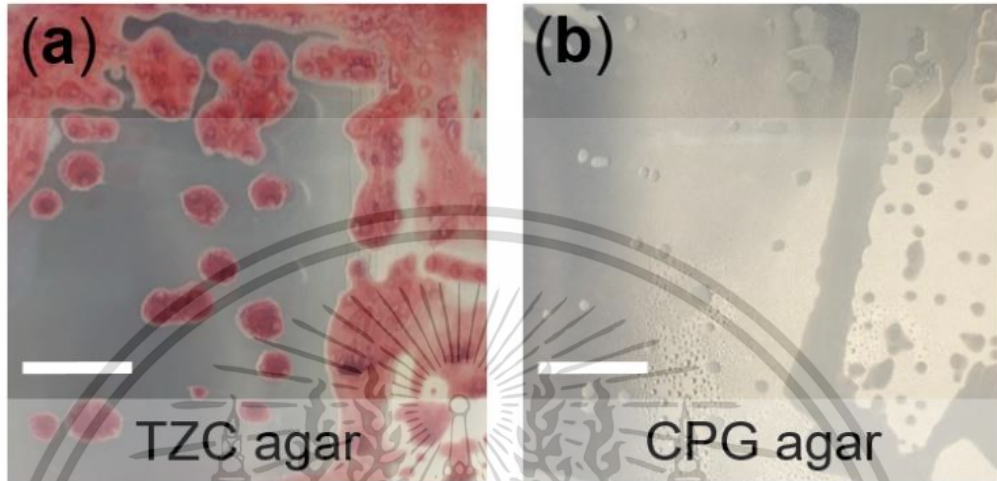
ตาราง ข.6 การประยุกต์ใช้วิธีการทูตี-เครเมอร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลร้อยละความถี่สัมพัทธ์ในการกระจายตัวของอนุภาคฟาจ C22 ผ่านกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) สำหรับการทดสอบ 4 สภาวะ

ตัวแปร	ค่า (Value)
Number of conditions	4
Degree of freedom	3
F-value	21.35
P-value	7.75E-13

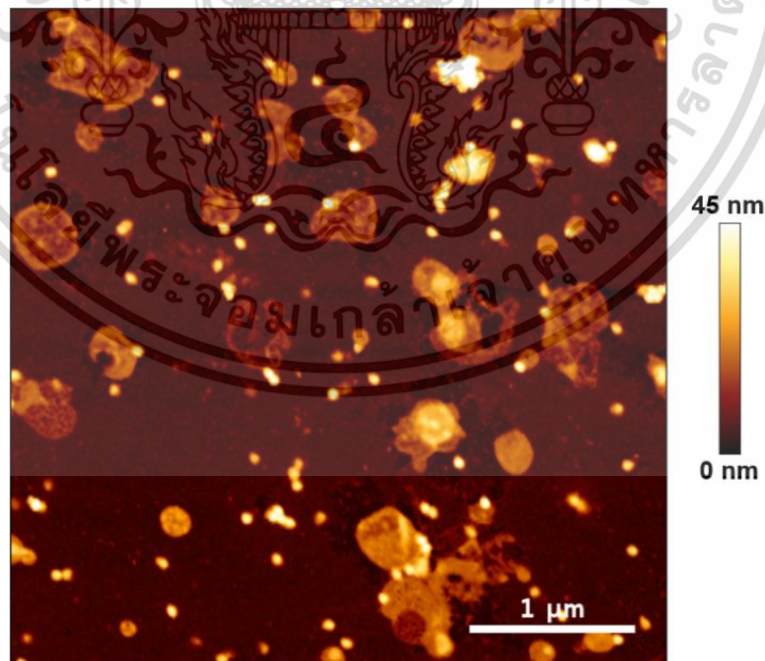
สภาวะ	กลุ่ม
C22 phage in MES buffer with 0.5 M sucrose	1
C22 phage in MES buffer with 0.5 M trehalose	1
C22 phage in MES buffer	2
C22 phage in MES buffer with 0.5 M mannitol	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

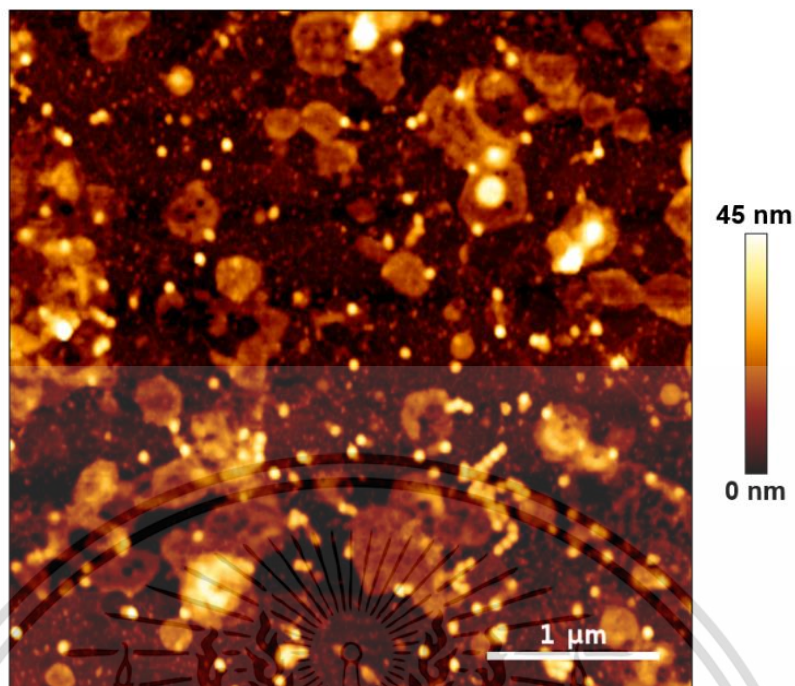
ภาคผนวก ค
รูปภาพที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง



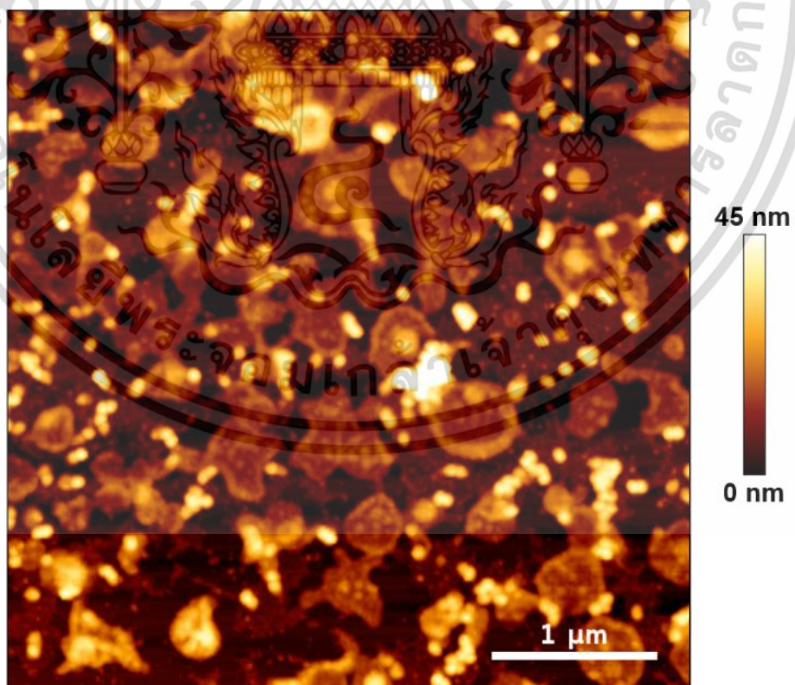
รูปที่ ค.1 เชื้อราลสโตเนีย โซลานาซีเอรัม สายพันธุ์ RS3/1-1 (Race 1 Biovar 4)
(a) เชื้อถูกแยก (Isolation) บนอาหาร TZC (b) เชื้อถูก Subsequent บนอาหารรุ้นแข็ง CPG
โดย Scale bar เท่ากับ 1 cm



รูปที่ ค.2 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

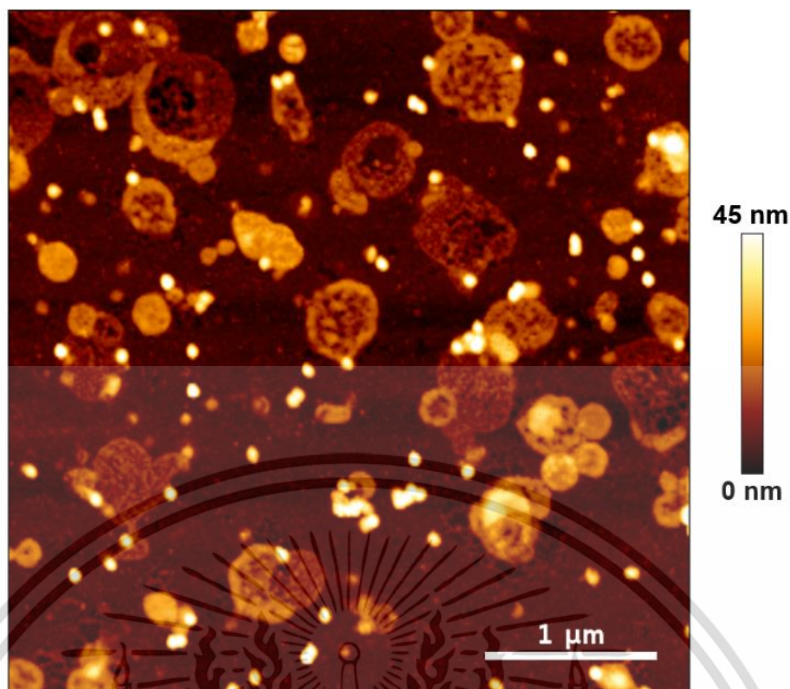


รูปที่ ค.3 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ

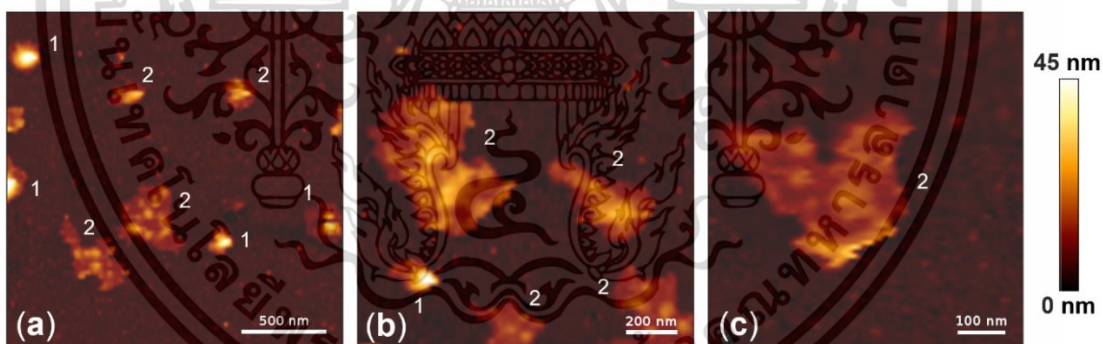


รูปที่ ค.4 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับทรีฮาโลสที่ความเข้มข้น 0.5 M จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ

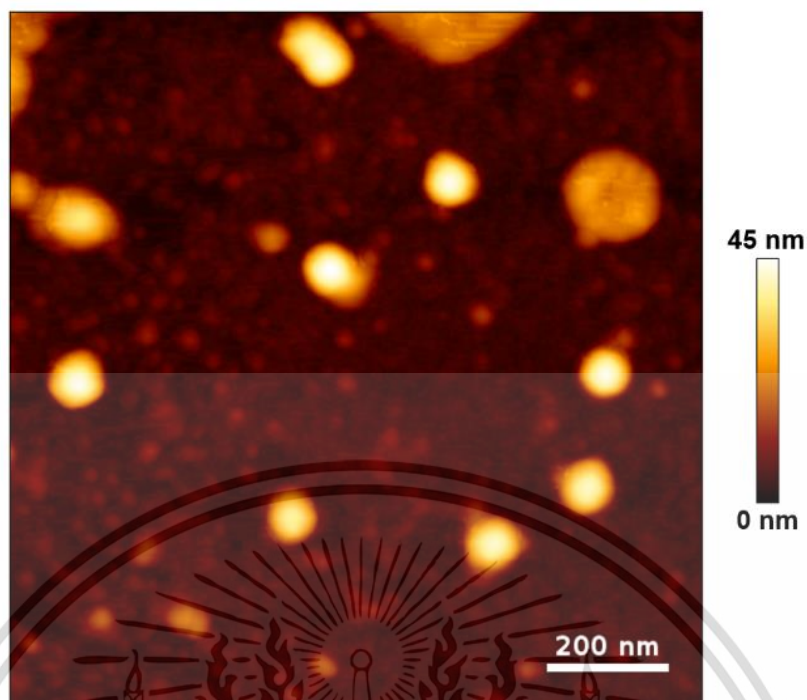
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.5 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ



รูปที่ ค.6 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 M จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม ซึ่งพื้นที่ในการสแกนแต่ละรูปเท่ากับ (a) $4 \mu\text{m}^2$ (b) $1.5 \mu\text{m}^2$ (c) $0.25 \mu\text{m}^2$ โดยหมายเลข 1 แทนอนุภาคฟาจ C22 ที่ถูกทำลาย หมายเลข 2 แทนเศษซากอนุภาคฟาจ C22 โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ



รูปที่ ค.7 อนุภาคฟาจ C22 หลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES ผสมกับซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 M ในอาหารเหลว CPG จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม โดย Color scale bar บอกความสูงในแนวตั้งฉากกับระนาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวณัฐธิดา มั่นบัว
วัน เดือน ปีเกิด	22 มกราคม 2542
ที่อยู่	27 ม.5 ต.วังอิทก อ.บางระกำ พิจิตร 65140
ประวัติการศึกษา	2562 วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์	
พ.ศ. 2562	ฝึกงานที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เป็นระยะเวลา 2 เดือน
พ.ศ. 2563	นำเสนอผลงานวิชาการหัวข้อ Optimization of C22 bacteriophage lyophilization factors using Response Surface Methodology ในงานสมาคมวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย (TIChE) ครั้งที่ 31
พ.ศ. 2563	ตีพิมพ์งานวิจัยในหัวข้อ Efficacy of sugar excipients on lyophilized C22 phage infectivity evaluated by atomic force microscopy วารสาร Biological control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้