

## การปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันเพื่อการเก็บรักษาแบคทีเรียระยะยาว

นันท์ธร เภาราช\* และ กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

\*อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ: Nanthorn.p@chula.ac.th

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสม ได้แก่ นมพว่องมันเนย โมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) และซูโครส ที่ความเข้มข้น 10 % ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia Coli* แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus Aureus* และแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ *Bacillus Subtilis Subtilis* ด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐาน และปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแทนขั้นตอน Primary Drying เพื่อเก็บรักษาแบคทีเรียได้เป็นระยะเวลานานโดยมีคุณสมบัติคงเดิม กระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานที่มีขั้นตอน Primary Drying 3 ชั่วโมง และ Secondary Drying 2 ชั่วโมง และใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น จะให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด โดยการรอดชีวิตของ *E. coli*, *S. Aureus* และ *B. Subtilis* เท่ากับ  $99.02 \pm 0.43\%$ ,  $96.03 \pm 0.24\%$  และ  $94.02 \pm 0.30\%$  ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวเป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ไนโตรเจนเหลวแทนขั้นตอน Primary Drying และใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น กระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวทำได้โดยแช่หลอดแอมพูลที่มีแบคทีเรียในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยขั้นตอน Secondary Drying เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 เดือน พบว่า *E. Coli*, *S. Aureus* และ *B. Subtilis* มีการรอดชีวิตเท่ากับ  $97.46 \pm 0.53\%$ ,  $96.89 \pm 0.68\%$  และ  $91.54 \pm 0.10\%$  ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีเดิมที่มีค่าเท่ากับ  $96.28 \pm 0.25\%$ ,  $98.15 \pm 0.33\%$  และ  $92.25 \pm 0.17\%$  ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สามารถใช้ไนโตรเจนเหลวในกระบวนการไลโอไฟล์เซชันเพื่อเก็บรักษาแบคทีเรียได้โดยลดระยะเวลากระบวนการได้ 2 ชั่วโมง

**คำสำคัญ:** กระบวนการไลโอไฟล์เซชันแบบใหม่, ไนโตรเจนเหลว, กลไกการป้องกันความเย็น, คลังจุลินทรีย์, การรอดชีวิต

## Improvement of Lyophilization for Long-term Bacterial Preservation

Nanthorn Paorach\* and Kobchai Pattaragulwanit

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathum Wan, Bangkok 10330, Thailand

\*Corresponding author: Nanthorn.p@chula.ac.th

### Abstract

This study aimed to determine the most suitable lyoprotectant for preserving bacteria by standard lyophilization. Three lyoprotectants, including skim milk, sucrose and monosodium glutamate (MSG), were evaluated at concentrations of 10%(w/v) were evaluated for their protective effects on the survival of the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, and Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and the spore-forming gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. In addition, a modified lyophilization process was developed by replacing primary drying step with liquid nitrogen to reduce the processing time while maintaining long-term bacterial viability and stability. The highest survival rate of all tested bacteria obtained when 10% (w/v) MSG was used as lyoprotectant for lyophilization with primary drying and secondary drying of 3 and 2 h, respectively, after 6 months preservation at 4°C. The survival rate of *E. Coli*, *S. Aureus*, and *B. Subtilis* were  $99.02 \pm 0.43\%$ ,  $96.03 \pm 0.24\%$ , and  $94.02 \pm 0.30\%$ , respectively. However, this method was time-consuming. Therefore, this study used liquid nitrogen instead of the primary drying step and selected a 10% MSG as the lyoprotectant. The modified lyophilization process involved immersing ampoules containing bacteria in liquid nitrogen for 30 seconds, followed by a secondary drying step for 3 h. The results showed that the modified lyophilization method yielded survival rates after 24 months of storage at 4°C for *E. Coli*, *S. Aureus*, and *B. Subtilis* of  $97.46 \pm 0.53\%$ ,  $96.89 \pm 0.68\%$  and  $91.54 \pm 0.10\%$ , respectively. These survival rates were similar to those achieved with the traditional lyophilization process, which had survival rates for *E. Coli*, *S. Aureus* and *B. Subtilis* of  $96.28 \pm 0.25\%$ ,  $98.15 \pm 0.33\%$  and  $92.25 \pm 0.17\%$  respectively. Therefore, we concluded that liquid nitrogen can successfully replace the primary drying step, reducing the lyophilization process by 2 h while maintaining effective long-term bacterial preservation.

**Keywords:** Lyophilization Alternative Method, Liquid Nitrogen, Lyoprotectant Mechanism, Microbial Culture Collection, Survival

## บทนำ

การนำจุลินทรีย์มาใช้อย่างมีประสิทธิภาพที่หลากหลาย เช่น ใช้ในการเรียนการสอน การวิจัยเพื่อการพัฒนาในด้านต่างๆ ทั้งทางด้านการแพทย์ ด้านการเกษตร ด้านอุตสาหกรรม และด้านสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ (Pure Culture) และคุณลักษณะคงที่ ดังนั้นการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้จึงเป็นสิ่งสำคัญ ต้องมีการดูแลอย่างถูกต้องและเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสมเพื่อช่วยให้จุลินทรีย์คงความบริสุทธิ์ไม่เกิดการปนเปื้อน มีการรอดชีวิตสูง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการกลายพันธุ์ สามารถนำไปใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย, 2559; Pupa et al., 2021) งานวิจัยของคณาจารย์และนิสิตรวมทั้งการเรียนการสอนของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะต้องใช้จุลินทรีย์ในการทดลอง ดังนั้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอด ไว้เป็นสต็อกอย่างเพียงพอจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง การเก็บรักษาจุลินทรีย์สามารถเก็บได้ทั้งแบบระยะสั้นและระยะยาว การเก็บรักษาจุลินทรีย์ระยะสั้น เช่น การต่อเชื้อใหม่ (Subculturing) วิธีนี้มีข้อเสียคือ เมื่อต่อเชื้อใหม่บ่อยครั้งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นระหว่างการถ่ายเชื้อและอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ได้ (Ayala-Zermeño et al., 2017) การเก็บรักษาจุลินทรีย์ระยะยาวทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น การเก็บรักษาจุลินทรีย์ภายใต้พาราฟินเหลว การเก็บรักษาจุลินทรีย์บนตัวกลางที่แห้ง (Drying) การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิเยือกแข็งตั้งแต่ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส (Freezing) การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส เป็นต้น การเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งหรือกระบวนการไลโอไฟล์เซชัน (Freeze Drying หรือ Lyophilization) เป็นวิธีที่นิยมอย่างมาก ใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์จำนวนมาก เนื่องจากประหยัดพื้นที่เก็บ สะดวกต่อการเคลื่อนย้าย จุลินทรีย์คงคุณสมบัติไว้ได้เหมือนเดิมและมีชีวิตรอดได้นานมากกว่า 10 ปี กระบวนการไลโอไฟล์เซชันมีสามขั้นตอน คือ การแช่แข็ง (Freezing) เป็นขั้นตอนที่ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ทำโดยการลดอุณหภูมิของสารละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส (Fonseca et al., 2014; Luo et al., 2020; Rockinger et al., 2021) เพื่อให้ให้น้ำภายในและภายนอกเซลล์เกิดการแข็งตัว การแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำเกินไปจะส่งผลให้ผิวเมมเบรนของจุลินทรีย์เสียรูปไป เมื่อแช่แข็งอย่างช้าๆ จะส่งผลให้เซลล์มีการคายน้ำที่มากขึ้นซึ่งเกิดจาก Hyperosmotic และผลึกน้ำแข็งจะมีการก่อตัวขนาดใหญ่สร้างความเสียหายต่อผนังเซลล์โดยตรง ขั้นตอนนี้จะทำให้เกิดโครงสร้างของผลึกน้ำแข็งทั้งขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน (Morgan และ Vesey, 2010) การทำแห้งปฐมภูมิ (Primary Drying) ทำให้จุลินทรีย์ในหลอดแอมพูลเยือกแข็งและแห้งขณะที่หมุนเหวี่ยง น้ำจะถูกดูดออกไปจนเหลือน้ำภายในเซลล์จุลินทรีย์เพียง 5 - 10% ขั้นนี้ใช้เวลา 3 - 4 ชั่วโมง และอาจใช้เวลาเป็นวันกว่าจะเสร็จสิ้น ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ปริมาณของตัวอย่าง และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้ง เป็นต้น (Kumar et al., 2012; Nowak และคณะ, 2020) และการทำแห้งทุติยภูมิ (Secondary Drying) น้ำจะถูกดูดออกไปจนเหลือน้ำภายในเซลล์จุลินทรีย์เพียง 1 - 2% ภายใต้ระบบสุญญากาศ ใช้เวลา 2 - 4 ชั่วโมง (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2544) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเสถียรสูงเนื่องจากปริมาณน้ำที่เหลืออยู่น้อย ทำให้สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน มีอัตราการปนเปื้อนต่ำ สามารถเก็บรักษาและขนส่งได้ง่ายภายใต้อุณหภูมิห้อง สามารถละลายผลิตภัณฑ์เพื่อนำมาใช้ได้ง่ายและรวดเร็ว (Sandhya และ Disha, 2019, Rockingera et al., 2021) การเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชัน จำเป็นต้องใช้สารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายระหว่างการแช่เยือกแข็ง ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากขั้นตอนการแช่แข็งในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ซึ่งการเย็นลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้เซลล์ตาย เนื่องจากการก่อตัวเป็นน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว บางครั้งน้ำจะถูกดึงออกจากเซลล์ระหว่างการทำให้เซลล์ขาดน้ำและตายได้ โมเลกุลของน้ำจะกลายเป็นน้ำแข็ง ซึ่งผลึกน้ำแข็งจะทิ่มแทงเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ (Sankha, 2018; Chen et al., 2019; Ge et al., 2024; Mohammadipanah et al., 2017; Kim et al., 2018) สารป้องกันความเย็นมีหลายชนิด เช่น skim milk ทำหน้าที่เคลือบผิวเซลล์และช่วยลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ และช่วยรักษาสมดุลน้ำรอบเซลล์ (Wong et al., 2010) โมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นสารในรูปผลึกสีขาว ไม่สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ ทำหน้าที่ช่วยรักษาสมดุลแรงดันออสโมซิสและช่วยคงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ ลดการเสียหายของโปรตีนเมื่อถูกแช่แข็ง มีกลไกการปกป้องเซลล์โดยการสร้างชั้นหุ้มรอบผนังเซลล์เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายจากผลึกน้ำแข็งเจาะ สามารถช่วยให้การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นถึง 40 - 70% และมักใช้ร่วมกับสารอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ (Carvalho et al., 2003; Chen et al., 2023; Rockinger et al., 2021) และซูโครส เป็นสารที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้เล็กน้อย รักษาเซลล์โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ก่อนการแช่แข็ง เพื่อลดการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ และช่วยคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์เสียหายน้อยลง (Sompach et al., 2022) สารป้องกันความเย็นแต่ละชนิดอาจให้ประสิทธิภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในกระบวนการไลโอไฟล์เซชันที่แตกต่างกันไป ดังนั้นจึงต้องหาสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมทั้งสำหรับแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก (Stefanello et al., 2019; Wang et al., 2021) นอกจากนี้เวลาของกระบวนการไลโอไฟล์เซชันก็ยังส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียเช่นกัน (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2544; Prakash et al., 2013) ถึงแม้กระบวนการไลโอไฟล์เซชันเป็นวิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ แต่วิธีนี้ใช้ระยะเวลาในการดำเนินการหลายชั่วโมงและมีขั้นตอนยุ่งยาก

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันให้ประหยัดทั้งเวลา แรงงานและพลังงานไฟฟ้า ลดขั้นตอนการทำงาน รวมถึงต้องการลดต้นทุนค่าใช้จ่าย โดยการใช้ไนโตรเจนเหลวมาแทนขั้นตอน Primary Drying โดยศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียที่ใช้ประจำในการเรียนการสอนของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งศึกษาหาสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสม ประเมินการรอดชีวิตและคุณสมบัติของแบคทีเรียหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 เดือน

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันได้ระยะเวลานาน และมีคุณสมบัติเหมือนเดิม
2. เพื่อปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแทนขั้นตอน Primary Drying
3. เพื่อประเมินระยะเวลาการเก็บรักษาและคุณสมบัติของแบคทีเรียหลังจากการเก็บรักษาด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันแบบใหม่

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 1. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

ใช้ลูปเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* จากคลังเก็บจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผิวหน้าเอียง Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง และขีดเชื้อข้างบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptone Soya Bean Broth (TSB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ระยะที่แบคทีเรียเจริญเต็มที่อยู่ในช่วง Late Log Phase)

#### 2. การเตรียมสารป้องกันความเย็น

สารป้องกันความเย็นที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ Skim Milk, ซูโครส และโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ความเข้มข้น 10% เตรียมสารป้องกันความเย็นแต่ละชนิดใส่หลอดทดลองขนาด 22 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดย Skim Milk นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับซูโครสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ MSG นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 3. กระบวนการไลโอไฟล์เซชัน (Lyophilization)

##### 3.1 กระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐาน (Primary Drying 3 ชั่วโมง และ Secondary Drying 2 ชั่วโมง)

นำแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เพาะเลี้ยงจากข้อ 1 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างเซลล์โดยการเติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนต์ปีเตอส์เบิร์กและนำมาปั่นเหวี่ยง โดยทำซ้ำสองครั้ง เทส่วนของเหลวทิ้งและเติมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1 (มีจำนวนเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU/ml) จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารป้องกันความเย็นที่เตรียมในข้อ 2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 10% ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer แล้วดูดแบ่งสารละลายแบคทีเรีย 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดแอมพูล ที่ผ่านการล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกและน้ำประปาจนสะอาด และผ่านนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเปลี่ยนจากจุกสำลีเป็นถุงผ้าดีแล้วนำเข้าเครื่อง Freeze Dryer เพื่อเข้าสู่ขั้นตอน Primary Drying ที่อุณหภูมิ -43 องศาเซลเซียส ความดัน 245 มิลลิบาร์ เมื่อครบเวลานำหลอดแอมพูลออกจากเครื่อง Freeze Dryer เปลี่ยนถุงผ้าที่คลุมปากหลอดเป็นจุกสำลี ตัดปลายสำลีให้พอดีกับปากหลอดด้วยกรรไกรปลอดเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วดันจุกสำลีลงไปเหนือปลาย Slant จากนั้นนำหลอดแอมพูลไปคอดคอดหลอดด้วยเปลวไฟความร้อนสูง โดยให้รอยคอดอยู่บริเวณเหนือจุกสำลีประมาณ 1 เซนติเมตร และให้บริเวณที่คอดมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำหลอดที่คอดแล้วไปเสียบเข้ากับเครื่อง Freeze Dyer เพื่อเข้าสู่ขั้นตอน Secondary Drying ที่อุณหภูมิ -86 องศาเซลเซียส ความดัน 60 มิลลิบาร์ ทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ เมื่อครบเวลา ปิดหลอดแอมพูลใน

สภาวะสุญญากาศโดยใช้เปลวไฟความร้อนสูงตรงบริเวณรอยคอดไปหลอมเพื่อคอดคอดหลุด (Constrict) ได้หลุดแอมพูลแบคทีเรียที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นนำหลอดแอมพูลไปเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 เดือน

### 3.2 กระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

นำแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เพาะเลี้ยงจากข้อ 1 โดยเตรียมเชื้อวิธีเดียวกับขั้นตอน 3.1 มาถ่ายเชื้อลงในสารป้องกันความเย็นที่คัดเลือกมาจากการบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานจากข้อ 3.1 ผสมแบคทีเรียและสารป้องกันความเย็นให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer แล้วดูดแบ่งสารละลายแบคทีเรียประมาณ 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดแอมพูล แล้วตัดปลายลำไส้ให้พอดีกับปากหลอดด้วยกรรไกรปลอดเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วดันจุกสำลีลงไป จากนั้นนำหลอดแอมพูลไปคอดคอดหลุดด้วยเปลวไฟความร้อนสูง โดยให้รอยคอดอยู่บริเวณเหนือจุกสำลีประมาณ 1 เซนติเมตร และให้บริเวณที่คอดมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำหลอดที่คอดแล้วไปแช่ไนโตรเจนเหลว เสียบเข้ากับเครื่อง Freeze Dryer เพื่อเข้าสู่ขั้นตอน Secondary Drying ที่อุณหภูมิ -86 องศาเซลเซียส ความดัน 60 มิลลิบาร์ ทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ เมื่อครบเวลา ปิดหลอดแอมพูลในสภาวะสุญญากาศโดยใช้เปลวไฟความร้อนสูงตรงบริเวณรอยคอดไปหลอมเพื่อคอดคอดหลุด (Constrict) ได้หลุดแอมพูลแบคทีเรียที่ผ่านการทำแห้งด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชัน จากนั้นนำหลอดแอมพูลไปเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวนี้จะแปรผันเวลาในขั้นตอนการแช่ไนโตรเจนเหลว 2 ช่วงเวลา คือ 20 วินาทีและ 30 วินาที และในขั้นตอน Secondary Drying แปรผันเวลา 4 ช่วงเวลา คือ 2 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12 และ 24 เดือน เพื่อการทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียโดยหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย ทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโดยทดสอบชีวเคมี และตรวจสอบความเป็นสุญญากาศของหลอดแอมพูล หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบกับกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐาน

## 4. การนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตด้วยวิธี Viable Plate Count

ทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้วยวิธี Viable Plate Count (นับจำนวนแบคทีเรียก่อนการทำแห้งด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันเปรียบเทียบกับเก็บรักษาเดือนต่างๆ) เปิดหลอดแอมพูลด้วยการใช้ตะไบตัดโดยรอบของหลอดบริเวณตรงกลางของลำไส้ที่อยู่ภายในหลอด จากนั้นทำการหักหลอดแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ลงไปผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายแบคทีเรียมาเจือจางในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% โดยวิธี 10 fold dilution ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA 10 ไมโครลิตร การเจือจางละ 3 หยดและทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียโดยเลือกเฉพาะความเข้มข้นที่นับจำนวนจุลินทรีย์ได้ระหว่าง 3 - 30 โคโลนี แล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรีย (Log CFU/ml) และคำนวณหาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (%)

$$\text{การรอดชีวิตของแบคทีเรีย (\%)} = \frac{(\text{Log CFU/ml ก่อน} - \text{Log CFU/ml หลัง}) \times 100}{\text{Log CFU/ml ก่อน}}$$

## 5. การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย

### 5.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบชีวเคมี

แบคทีเรียที่ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบชีวเคมีนำมาจากข้อ 3 ซึ่งการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียแต่ละชนิด มีดังนี้

1) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างลักษณะของเซลล์ และการสร้างสปอร์

2) การทดสอบ Methyl red และ Voges Proskauer (MR-VP)

ใช้ลูปแตะโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทดสอบไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP เมื่อแบคทีเรียเจริญให้แบ่งเป็น 2 หลอด หลอดแรกเติมสารละลาย methyl red 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าแบคทีเรียสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตและมีการผลิตกรดขึ้น ส่วนหลอดที่สองเติมสารละลาย  $\alpha$ -naphthol ความเข้มข้น 6% 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย KOH ความเข้มข้น 40% เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ถ้าเกิดสีชมพูหรือสีแดง แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ acetoin

### 3) การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตและการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ใช้ลูปและโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทดสอบไป streak บนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) และใช้เข็มเขี่ยเชื้อแต่ละโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทดสอบไป stab ลงในอาหาร TSI ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส แล็กโตสและซูโครสได้ ทั้งบนผิวและที่ก้นหลอดของอาหารจะเปลี่ยนจากสีส้มไปเป็นสีเหลืองทั้งหมด อ่านผลว่า A/A แต่ถ้าแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดได้เลย สีของอาหารจะไม่เปลี่ยน อ่านผลว่า N/N, K/N และ K/K การเกิดก๊าซจะเห็นเป็นรอยแยกหรือฟองก๊าซที่แทรกอยู่ในเนื้ออาหาร TSI และการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเห็นสีดำของตะกอนที่ก้นหลอด

### 4) การทดสอบการใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน

ใช้ลูปและโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทดสอบไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmon's citrate agar ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนได้

### 5) การทดสอบการเคลื่อนที่

โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแต่ละโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทดสอบไป stab ลงในอาหาร Semi solid media ถ้าแบคทีเรียเจริญเติบโตกระจายออกไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้

## 5.2 ทดสอบความเป็นสูลูญญากาศ

นำหลอดแอมพูลไปตรวจสอบความเป็นสูลูญญากาศภายในหลอด โดยใช้เครื่อง High-frequency Spark Tester หากหลอดแอมพูลที่เป็นสูลูญญากาศจะเห็นประกายแสงสีน้ำเงิน-ม่วงภายในหลอด สำหรับหลอดแอมพูลที่ไม่เป็นสูลูญญากาศจะไม่เห็นเห็นประกายแสงสีน้ำเงิน-ม่วงภายในหลอด

## 6. การคำนวณทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ (นับจำนวนแบคทีเรีย 9 ซ้ำ) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Post Hoc test) ด้วยวิธี LSD (Least Significant Difference)

## ผลการวิจัย

### 1. การทำแห้งด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐาน

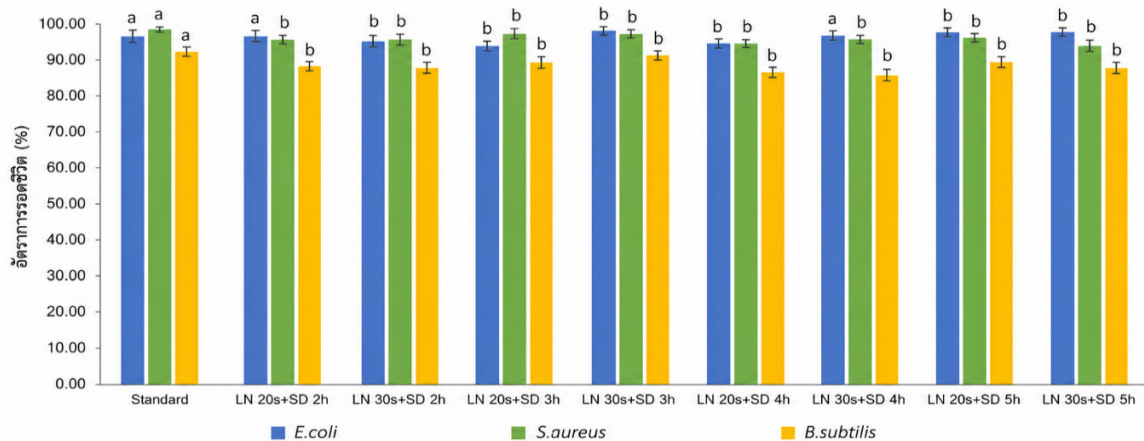
จากการทำไลโอไฟล์เซชันแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ *B. subtilis* เพื่อศึกษาการเก็บรักษาด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันที่มีขั้นตอน Primary Drying 3 ชั่วโมงและขั้นตอน Secondary Drying 2 ชั่วโมง โดยใช้สารป้องกันความเย็น 3 ชนิด ได้แก่ Skim Milk, ซูโครส และ MSG ความเข้มข้น 10% พบว่าลักษณะของเชื้อทั้ง 3 ชนิดหลังผ่านกระบวนการไลโอไฟล์เซชันจะมีลักษณะคล้ายกันคือ ลักษณะเป็น slant มีผงแห้งอยู่ภายใน สำหรับการรอดชีวิตของแบคทีเรียหลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานนั้น มีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียก่อนการทำแห้งเพื่อหาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (%) จากผลการทดสอบในตารางที่ 1 พบว่าเมื่อเก็บรักษาแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ 10% Skim Milk เป็นสารป้องกันความเย็น การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ประมาณ 93 - 95% เมื่อใช้ 10% ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็น พบว่า การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ประมาณ 86 - 94% และถ้าใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีการรอดชีวิตดีที่สุด โดยการรอดชีวิตของ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* เท่ากับ  $99.02 \pm 0.43\%$ ,  $96.03 \pm 0.24\%$  และ  $94.02 \pm 0.30\%$  ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น

**ตารางที่ 1** การอยู่รอด (%) ของแบคทีเรียหลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานด้วยสารป้องกันความเย็นชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

| ชนิดแบคทีเรีย      | การรอดชีวิตของแบคทีเรีย (%) |              |              |
|--------------------|-----------------------------|--------------|--------------|
|                    | 10% Skim milk               | 10% ซูโครส   | 10% MSG      |
| <i>E. coli</i>     | 95.16 ± 0.49                | 94.37 ± 0.31 | 99.02 ± 0.43 |
| <i>S. aureus</i>   | 95.17 ± 0.30                | 94.51 ± 0.42 | 96.03 ± 0.24 |
| <i>B. subtilis</i> | 93.86 ± 0.32                | 86.68 ± 0.28 | 94.02 ± 0.30 |

## 2. การทำแห้งด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

ผู้วิจัยปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen) เข้ามาใช้ในการแช่แข็งแบคทีเรียแทนขั้นตอน Primary Drying โดยใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น แปรผันเวลาในการแช่แข็งแบคทีเรียในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 20 วินาที และ 30 วินาที และในขั้นตอน Secondary Drying แปรผันเวลาเป็น 2 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง เก็บรักษาแบคทีเรียหลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันของงานวิจัยนี้เป็นเวลา 24 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวพบว่า พบว่าลักษณะแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด หลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดจะเป็นฟองอยู่ที่ก้นหลอด การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดพบว่าการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *E. coli* และ *S. aureus* มีการรอดชีวิตมากกว่า 94% ในขณะที่ *B. subtilis* มีการรอดชีวิตมากกว่า 83% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 24 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการแปรผันเวลาการแช่ไนโตรเจนเหลวและเวลาในขั้นตอน Secondary Drying พบว่า การแช่ไนโตรเจนเหลว 30 วินาที ร่วมกับขั้นตอน Secondary Drying 3 ชั่วโมง การรอดชีวิตของ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* เท่ากับ  $97.46 \pm 0.53\%$ ,  $96.89 \pm 0.68\%$  และ  $91.54 \pm 0.10\%$  ตามลำดับ ซึ่งมีการรอดชีวิตที่ใกล้เคียงกับกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานมากที่สุด ที่มีการรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับ  $96.28 \pm 0.25\%$ ,  $98.15 \pm 0.33\%$  และ  $92.25 \pm 0.17\%$  ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 24 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1)



**ภาพที่ 1** การรอดชีวิตของ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* หลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐาน (Standard) และใช้ไนโตรเจนเหลว (LN = Liquid Nitrogen, SD = Secondary Drying) ด้วยสารป้องกันความเย็น 10% MSG เก็บรักษาเป็นเวลา 24 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b) หมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

## 3. การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโดยทดสอบชีวเคมี และตรวจสอบความเป็นสปีชีส์ของหลอดแอมพูลของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด พบว่าทุกภาวะกระบวนการไลโอไฟล์เซชันและทุกเวลาการเก็บรักษา จะให้ผล

การทดสอบที่เหมือนกัน โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดหลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมีเหมือนกับแบคทีเรียก่อนกระบวนการไลโอไฟล์เซชัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมีและความเป็นสปีชีส์ของหลอดแอมพูลของแบคทีเรีย

| ลักษณะทางสัณฐานวิทยา/<br>ชีวเคมี/ความเป็นสปีชีส์ | <i>E. coli</i>            | <i>S. aureus</i>         | <i>B. subtilis</i>                      |
|--------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|
| ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์                       | ย้อมติดสีแดง รูปร่างแท่ง  | ย้อมติดสีม่วง รูปร่างกลม | ย้อมติดสีม่วง รูปร่างแท่งยาว สร้างสปอร์ |
| MR                                               | +                         | +                        | -                                       |
| VP                                               | -                         | +                        | +                                       |
| TSI                                              | acid butt/acid slant, Gas | acid butt/acid slant     | alkaline butt/acid slant                |
| Citrate                                          | -                         | +                        | +                                       |
| การเคลื่อนที่                                    | +                         | -                        | +                                       |
| ความเป็นสปีชีส์                                  | +                         | +                        | +                                       |

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง Positive result/หลอดเก็บเชื้อมีความเป็นสปีชีส์ เครื่องหมาย - หมายถึง Negative result

สำหรับค่าใช้จ่ายของกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานที่มีการแปรผันชนิดของสารป้องกันความเย็นนั้น พบว่า MSG มีต้นทุนต่อหลอดต่ำที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบต้นทุนทั้ง 2 กระบวนการ พบว่ากระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวนั้นมีต้นทุนที่ต่ำกว่ากระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานประมาณ 1 บาทต่อหลอด โดยต้นทุนของกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานนั้นมีราคาหลอดละ 53.16 บาท ในขณะที่ต้นทุนของกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวนั้นมีหลอดละ 51.97 - 52.72 บาท โดยต้นทุนที่คิดนี้ไม่รวมค่าอุปกรณ์และสารอาหารอื่นๆ คิดเฉพาะค่าไฟฟ้าและสารป้องกันความเย็น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความคุ้มค่าของค่าใช้จ่ายของกระบวนการไลโอไฟล์เซชันที่มีการแปรผันชนิดสารป้องกันความเย็น

| วิธีการเก็บรักษา                        | ต้นทุนต่อหลอด (บาท) |        |       |
|-----------------------------------------|---------------------|--------|-------|
|                                         | Skim milk           | ซูโครส | MSG   |
| Primary drying 3h+Secondary drying 2h   | 53.37               | 53.24  | 53.16 |
| Liquid nitrogen 20s+Secondary drying 2h | -                   | -      | 51.97 |
| Liquid nitrogen 30s+Secondary drying 2h | -                   | -      | 51.97 |
| Liquid nitrogen 20s+Secondary drying 3h | -                   | -      | 52.28 |
| Liquid nitrogen 30s+Secondary drying 3h | -                   | -      | 52.28 |
| Liquid nitrogen 20s+Secondary drying 4h | -                   | -      | 52.47 |
| Liquid nitrogen 30s+Secondary drying 4h | -                   | -      | 52.47 |
| Liquid nitrogen 20s+Secondary drying 5h | -                   | -      | 52.72 |
| Liquid nitrogen 30s+Secondary drying 5h | -                   | -      | 52.72 |

### สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบการเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันที่ใช้ขั้นตอน Primary Drying 3 ชั่วโมง และขั้นตอน Secondary Drying 2 ชั่วโมงของ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* พบว่าในการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น ทำให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด โดยการรอดชีวิตของ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* เท่ากับ  $99.02 \pm 0.43\%$ ,  $96.03 \pm 0.24\%$  และ  $94.02 \pm 0.30\%$  ตามลำดับ ดังนั้นการใช้ 10% MSG จึงเป็นสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ โดยให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียดีที่สุด

จากการปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแทนขั้นตอน Primary Drying นั้นพบว่าสามารถลดขั้นตอนการทำงานได้ 4 ขั้นตอนและลดระยะเวลาการทำงานได้ 2 ชั่วโมง จากเดิมที่กระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานที่มี 11 ขั้นตอนและใช้เวลา 5 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ลดลงไม่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย การรอดชีวิตของแบคทีเรียยังใกล้เคียงกับการ

เก็บรักษาด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐาน ซึ่งกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลว 30 วินาที และขั้นตอน Secondary Drying 3 ชั่วโมง ที่ใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น ให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด โดยการรอดชีวิตของ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* เท่ากับ  $97.46 \pm 0.53\%$ ,  $96.89 \pm 0.68\%$  และ  $91.54 \pm 0.10\%$  ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 24 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียและตรวจสอบความเป็นสปีชีส์ของหลอดแอมพูลของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดหลังกระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานและกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 24 เดือน พบว่า แบคทีเรียแต่ละชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมีเหมือนกับแบคทีเรียก่อนการทำแห้งด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชัน จากผลการทดสอบนี้แสดงว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาได้ระยะเวลานานถึง 24 เดือนเนื่องจากแบคทีเรียในหลอดแอมพูลถูกเก็บในสภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลทดสอบจากงานวิจัยนี้พบว่า การใช้ 10% MSG เป็นสารป้องกันความเย็น ทำให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด ซึ่ง MSG เป็นกรดอะมิโนที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์และชะลอการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งทั้งในและนอกเซลล์ ควบคุมความดันออสโมติก และสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนเพื่อเพิ่มความเสถียรของโครงสร้างจุลินทรีย์จึงสามารถปกป้องจุลินทรีย์จากความเย็นจัดได้ดี (Carvalho และคณะ, 2003) งานวิจัยของ Carvalho et al. (2003) ที่ใช้ MSG เป็นสารป้องกันความเย็นด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันเพื่อเก็บรักษาแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus durans* และ *Enterococcus faecalis* เป็นเวลา 120 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยแบคทีเรียมีการรอดชีวิตเท่ากับ 95.25, 93.28, 97.59, 92.08 และ 96.20% ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า MSG เป็นสารป้องกันความเย็นที่มีประสิทธิภาพดีในการเก็บรักษาแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติก MSG ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนระหว่างห่อหุ้มมีโนของ MSG กับหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนของแบคทีเรีย นอกจากนี้ *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 ที่เก็บรักษาด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ MSG ความเข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะรอดชีวิต 72.11% ซึ่งรอดชีวิตมากกว่าการใช้ซูโครสเป็นสารป้องกันความเย็นและการไม่เติมสารป้องกันความเย็นระหว่างกระบวนการไลโอไฟล์เซชัน (Pyar และ Peh, 2014) สำหรับงานวิจัยของ Tanimomo และคณะ, 2016 ที่ศึกษาการเก็บรักษา *Bifidobacterium Crudilactis* ด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันในขั้นตอน Primary Drying 69 ชั่วโมง และ Secondary Drying 6 ชั่วโมง และใช้ MSG เป็นสารป้องกันความเย็น สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน ซึ่งแบคทีเรียมีการรอดชีวิตประมาณ 90% สำหรับการปรับปรุงกระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแทนขั้นตอน Primary Drying นั้น แบคทีเรียมีการรอดชีวิตสูงเทียบเท่ากับการใช้กระบวนการไลโอไฟล์เซชันวิธีมาตรฐานหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 เดือน โดยที่แบคทีเรียยังคงคุณสมบัติเหมือนเดิมไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Strasser et al. (2009) ที่ได้ศึกษาการเก็บรักษาแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติก 2 ชนิด คือ *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus plantarum* ด้วยกระบวนการไลโอไฟล์เซชันที่ใช้สารป้องกันความเย็น 4 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส ทรีฮาโลส และมอลโตเดกตริน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 22 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มีการรอดชีวิตได้ดีที่สุดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และในที่มืด และงานวิจัยของ Shekh et al. (2020) ที่ใช้กระบวนการไลโอไฟล์เซชันในการทำแห้ง *Lactobacillus plantarum* GP ด้วยสารป้องกันความเย็นหลายชนิด ทั้งสารป้องกันความเย็นชนิดเดียวและผสม เช่น แกลกอล ซูโครส และนมพร่องมันเนย โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า *Lactobacillus plantarum* GP มีชีวิตรอดมากถึง 98% และยังคงคุณสมบัติเหมือนเดิม

กระบวนการไลโอไฟล์เซชันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแทนขั้นตอน Primary Drying จะช่วยลดระยะเวลาดำเนินการอย่างมาก รวมทั้งประหยัดแรงงาน มีต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำ และลดค่าใช้จ่ายของภาควิชาฯ ได้ สามารถนำกระบวนการไลโอไฟล์เซชันที่ปรับปรุงนี้ไปประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น รวมทั้งยีสต์และราชนิดอื่นที่ใช้สำหรับการเรียนการสอนและงานวิจัยของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการวิจัยเพิ่มเติมในอนาคต มีการศึกษาการเก็บรักษาจุลินทรีย์ทุก ๆ ปี เป็นเวลาอย่างน้อย 5 ปี ทดสอบภาวะการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวมถึงการทดสอบสารป้องกันความเย็นชนิดอื่น ๆ ทั้งแบบชนิดเดียวและผสม เนื่องจากความสามารถในการป้องกันความเย็นของสารป้องกันความเย็นแต่ละชนิดจะให้ผลที่แตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุน ทุนวิจัยสำหรับบุคลากรสายสนับสนุนกองทุนเพื่อการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2563 และปีงบประมาณ 2566 ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตลอดถึงความสะดวกสำหรับการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- ศูนย์ชีววัตถุประเทศไทย. (2559). *คู่มือการเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีการระเหยแห้งในสภาวะสุญญากาศ (Liquid-drying)*. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. (2544). *เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Andrade-Michel, G. Y., Rodríguez-Rodríguez, J. C., Arredondo-Bernal, H. C., & Montesinos-Matías, R. (2017). Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal Biology*, 121(11), 920-928.
- Carvalho, S. A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. A. (2003). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait*, 83(3), 203-210.
- Chen, B., Wang, X., Li, P., Feng, X., Mao, Z., Wei, J., Lin, X., Li, X., & Wang, L. (2023). Exploring the protective effects of cryoprotectants during freeze-drying. *LWT*, 173, 114295.
- Fonseca, F., Cénard, S., & Passot, S. (2014). *Freeze-drying of lactic acid bacteria*. Totowa, NJ: Humana Press
- Ge, S., Han, J., Sun, O., Ye, Z., Zhou, Q., Li, P., & Gu, Q. (2024). Optimization of cryoprotectants for improving the freeze-dried survival rate of potential probiotic *Lactococcus lactis* ZFM559 and evaluation of its storage stability. *LWT*, 198, 116052.
- Kim, M., Nam, D. G., Kim, S. B., Im, P., Choe, J. S., & Choi, A. J. (2018). Enhancement of viability, acid and bile tolerance, and accelerated stability in lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with protective agent. *Food Science & Nutrition*, 6(7), 1904-1913.
- Kumar, S., Kashyap, P. L., Singh, R., & Srivastava, A. K. (2012). Preservation and maintenance of microbial cultures. In V. C. Kalia (Ed.), *Analyzing microbes* (pp. 135–152). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1584-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1584-4_8)
- Luo, C., Liu, Z., Mi, S., & Li, L. (2022). Quantitative investigation on the effects of ice crystal size on freeze-drying: The primary drying step. *Drying Technology*, 40(4), 757-768.
- Mohammadipanah, F., Parviz, L., Hamed, J., & Azizmohseni, F. (2017). Protective effects of cryoprotectants and lyoprotectants on the survival of persipptide-producing *Streptomyces zagrosensis* UTM 1154. *BioPreservation and BioBanking*, 15(5), 451-456.
- Morgan, C. A., & Vesey, G. (2009). Freeze-drying of microorganisms. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of microbiology* (3rd ed., Vol. 2, pp. 162–173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00114-0>
- Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). 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*, 9(10), 1488.
- Prakash, O., Nimkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1–9.
- Pupa, P., Apiwatsiri, P., Sirichokchatchawan, W., Pirarat, N., Muangsin, N., Shah, A. A., & Prapasarakul, N. (2021). The efficacy of three double-microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Scientific Reports*, 11, 13753.
- Pyar, H., & Peh, K. K. (2014). Cost effectiveness of cryoprotective agents and modified de Man, Rogosa and Sharpe medium on growth of *Lactobacillus acidophilus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(4), 462-471.

- Rockinger, U., Funk, M., & Winter, G. (2021). Current approaches of preservation of cells during (freeze)-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(8), 2873-2893.
- Sandhya, M., & Disha, K. (2020). Expansion in the field of freeze-drying: An advanced review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(5), 2468-2474.
- Sankha, B. (2018). *Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process*. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Shekh, S. L., Boricha, A. A., Chavda, J. G., & Vyas, B. R. M. (2020). Probiotic potential of lyophilized *Lactobacillus plantarum* GP. *Annals of Microbiology*, 70(1), 16.
- Sompach, G., Rodklongtan, A., Nitinprasert, S., & Chitprasert, P. (2022). Microencapsulating role of whey protein isolate and sucrose in protecting the cell membrane and enhancing survival of probiotic *Lactobacilli* strains during spray drying, storage, and simulated gastrointestinal passage. *Food Research International*, 159, 111651.
- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilization with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90-94.
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., & Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 167-177.
- Tanimomo, J., Delcenserie, V., Taminiau, B., Daube, G., Saint-Hubert, C., & Durieux, A. (2016). Growth and freeze-drying optimization of *Bifidobacterium crudilactis*. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 616-626.
- Wang, G. Q., Pu, J., Yu, X. Q., Xia, Y. J., & Ai, L. Z. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066-3075.
- Wang, G., Luo, L., Dong, C., Zheng, X., Guo, B., Xia, Y., Tao, L., & Ai, L. (2021). Polysaccharides can improve the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* subjected to freeze-drying. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 2606-2614.