บทที่ 5

อภิปราย สรุปผล และข้อเสนอแนะ

1. การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้ lysate เป็นกลางแบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer

จากผลการทดลองสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer เพื่อสกัดพลาสมิดโดยการใช้ด่างแก่ผสม SDS ทำให้เซลล์แตก จากนั้นตกตะกอนเศษเซลล์และโปรตีนอย่างต่อเนื่องด้วย 3 M โพแทสเซียมอะซีเตท แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองคือ ที่อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาพบว่าการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางยาวขึ้น (มากกว่า 30 ซม. เป็นต้นไป) ปริมาณพลาสมิดที่ได้มีแนวโน้มที่ลดลงผกผันกับระยะทางที่ยาวขึ้น แสดงให้เห็นว่าระยะทางเพียง 30 เซนติเมตรก็เพียงพอต่อการสลายเซลล์และการทำให้ lysate เป็นกลาง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสลายเซลล์ด้วยด่างประมาณ 2 วินาทีซึ่งการทดลองที่อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาประมาณ 3.77 และ 1.88 วินาทีในระยะทาง 30 เซนติเมตร ส่วนอัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที มีประสิทธิภาพการสกัดพลาสมิดที่ต่ำที่สุดเพราะที่ระยะทาง 30 เซนติเมตรใช้เวลาในการสลายเซลล์ด้วยด่างเพียง 0.94 วินาที ส่วนขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทาง 30 เซนติเมตรก็เพียงพอเช่นกัน และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้ lysate เป็นกลางประมาณ 1.5 วินาที ซึ่งการทดลองที่อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาประมาณ 2.83 และ 1.41 วินาที ในระยะทาง 30 เซนติเมตร ส่วนที่อัตราการไหล 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลา 0.71 วินาที แสดงให้เห็นว่าอัตราการไหลสารที่สูงเกินไปทำให้การผสมและการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์แขวนลอยกับสารละลายด่างแก่ และสารทำให้เป็นกลางเกิดขึ้นได้ไม่ดี เพราะระยะเวลาที่เร็วเกินไปสารผสมทั้ง 3 ผสมกันยังไม่ดีส่วนประกอบต่าง ๆ ก็จะถูกชะออกจากกระบวนการสมบูรณ์ทำให้ผลผลิตของพลาสมิดที่ได้ต่ำและส่วนอัตราการไหลที่ 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้ผลผลิตพลาสมิดใกล้เคียงกันและเมื่อระยะทางมากขึ้นปริมาณพลาสมิดที่ได้มีแนวโน้มที่จะลดลงเหมือนกัน

2. การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องประกอบกับการใช้ถังกวน

จากผลการทดลองการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผสมระหว่างเซลล์แขวนลอยกับสารละลายด่างในการทำงานของถังกวน โดยการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ที่อัตราการไหล 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่าน In-Line Static Mixer เป็นระยะทาง 60 เซนติเมตร แล้วให้ lysate ไหลไปรวมกันในถังกวนขนาดความจุ 10 ลิตร ที่อัตราเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที แล้วกวนย่อยไปเป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างของ lysate จากถังกวนที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ของการกวนภายในถังให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.33, 7.33 และ 6.97 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการสลายเซลล์ใน In-Line Static Mixer เมื่อระยะทางหรือระยะเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอก็จะลดลงเช่นกัน จากนั้นเมื่อครบเวลา 10 นาที ในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างเริ่มทำการไหลสารที่ทำให้ lysate เป็นกลางลงไปภายในถังกวนด้วยอัตราการไหล 250 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการกวนด้วยใบพัดต่อไปอีก 30 นาที ทำการเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาทีตามลำดับ พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 6.96, 7.29 และ 6.96 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งการทำให้ lysate เป็นกลางในระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Chamsart, 2001) ว่าระยะเวลาในช่วง 5 นาที ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และระยะเวลา 30 นาทีของการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวนมีผลปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้น้อยมาก แต่ถ้าระยะเวลาการทดลองมากกว่านี้ผลผลิตที่ได้จะลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้ปริมาณ พลาสมิดดีเอ็นเอ 6.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ในการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ก่อนลงถังกวนและทำให้ lysate เป็นกลางแบบต่อเนื่องในถังกวนมีปริมาณ พลาสมิดดีเอ็นเอที่มากกว่า

3. การสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน

จากผลการทดลองทำโดยการไหลเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 ลิตรต่อนาที ลงในถังกวนที่อัตราเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที จากนั้นไหลสารละลายด่างแก่ลงไปในถังเดียวกันที่อัตราการไหล 2 ลิตรต่อนาที ปล่อยให้สารทั้งสองกวนผสมกันเป็นเวลารวม 10 นาที ขณะเดียวกันเก็บตัวอย่างของ lysate ที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 6.66, 6.66 และ 6.30

มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการสลายเซลล์ใน In-Line Static Mixer เมื่อระยะทางหรือระยะเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอจะลดลงเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ก่อนลงถังกวน พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ต่ำกว่าเล็กน้อย เพราะการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ก่อนลงถังกวนจะช่วยให้การสลายเซลล์สมบูรณ์มากขึ้น จากนั้นเมื่อกวนผสม lysate เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทำการไหลสารที่ทำให้ lysate เป็นกลางลงไปในถังกวนด้วยอัตราการไหล 1 ลิตรต่อนาที ทำการกวนผสมเป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาทีตามลำดับ พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.65, 7.29 และ 6.90 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ก่อนลงถังกวนคือ ที่ระยะเวลา 30 นาที จะได้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่ำกว่าที่ระยะเวลา 5 และ 15 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ 6.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางแบบต่อเนื่องในถังกวนมีปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่มากกว่า

จากการศึกษาการสลายเซลล์ที่ได้กล่าวมาทั้ง 3 การทดลองกล่าวโดยสรุปรวมได้ว่า ระยะทางและระยะเวลาในการสลายเซลล์มีผลต่อการสลายเซลล์ คือเมื่อระยะทางเพิ่มมากขึ้นผลผลิตพลาสมิดจะลดลง ระยะเวลานานเกินไปหรือน้อยไปจะมีผลต่อปริมาณพลาสมิดเช่นกัน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สูงกว่าการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ก่อนลงถังกวนและการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องในถังกวน เพราะการผสมสารต้องทำอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันพลาสมิดเสียหายและการผสมของสารต้องไม่ก่อให้เกิดการที่สารละลายด่างสะสมอยู่เฉพาะจุดเพราะการกวนส่วนผสมไม่มีประสิทธิภาพ การตกลงสู่ก้นถังของสารทำให้ lysate เป็นกลางเนื่องจากการกวนไม่ดีพอ โครโมโซมอลดีเอ็นเอ และเศษเซลล์นั้นไวต่อแรงเฉือนซึ่งจะทำให้มันแตกและทำให้เกิดความยุ่งยากในขั้นตอนการทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ ฉะนั้นต้องลดแรงเฉือนให้น้อยที่สุดขณะที่มีการกวน ปัญหาของ rheological complexicity ของของเหลวเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น viscoelastic ซึ่งทำให้ยากต่อการกวน การทำให้ lysate เป็นกลางต้องทำให้ทั่วถึงมิฉะนั้น lysate จะเป็นอุปสรรคต่อกระบวนการกรองในขั้นต่อไป สามารถทำได้อย่างต่อเนื่องซึ่งเป็นการนำไปสู่การพัฒนาเครื่องสกัดพลาสมิดอัตโนมัติและต้นทุน อุปกรณ์ที่ใช้ถูกกว่าการใช้ถังกวนอย่างมาก

4. การศึกษาการกรองอย่างต่อเนื่องต่อจากกระบวนการสลายเซลล์

จากผลการทดลองการสลายเซลล์และการกรองแบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหล 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อเปรียบเทียบปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการผ่านเครื่องกรองกับปริมาณพลาสมิดที่ไม่ผ่านกระบวนการกรอง พบว่าปริมาณพลาสมิดที่ได้จากกระบวนการผ่านเครื่องกรองเฉลี่ย 7.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ มีปริมาณพลาสมิดที่มากกว่าปริมาณพลาสมิดที่ไม่ผ่านกระบวนการกรองที่ได้จากการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.00, 5.18 และ 6.03 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ เพราะว่ากระบวนการกรองนี้จะมี diatomaceous earth เป็นสารช่วยกรองที่ผสมอยู่ในสารทำให้เป็นกลางช่วยกรองเศษเซลล์ต่าง ๆ ลดการปนเปื้อนทำให้พลาสมิดที่ได้บริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งวิธีนี้จะช่วยให้กระบวนการสลายเซลล์เป็นไปอย่างต่อเนื่องทั้งกระบวนการสลายเซลล์ด้วยด่าง การทำให้ lysate เป็นกลาง และการกรองเป็นการประหยัดเวลาและช่วยทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วย

5. คุณสมบัติทางรีโอโลยี

5.1 การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้เป็นกลางแบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับอัตราแรงเฉือน การสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer พบว่าความหนืดของ lysate ที่ได้จากการสลายเซลล์แบคทีเรียด้วยด่างขึ้นอยู่กับจีโนมิคดีเอ็นเอเป็นสำคัญค่าความหนืดของ lysate ลดลงตามระยะทางที่เพิ่มขึ้น เวลาที่นานขึ้นและอัตราการไหลที่สูงขึ้นด้วย ที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ 125: 250, 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตรจะมีค่าความหนืดสูงกว่าที่ระยะทาง 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับ เพราะที่ระยะทางมากขึ้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือเสียสภาพเนื่องจากระยะทางยาวนั้นเวลาที่ดีเอ็นเอถูกแรงเฉือนของ In-Line Static Mixer และด่างทำลายนานขึ้นทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลง ดังนั้นความหนืดจึงลดลงสังเกตได้จากสีผสมที่เกิดขึ้นจากการทดลอง (Chamsart, 2001) จะเห็นว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร จะมีสีแดงเข้มเมื่อระยะทางเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 90 เซนติเมตร ระดับความเข้มของสีแดงจะจางลงและใสขึ้น เมื่อนำตัวอย่างที่ระยะทางทั้ง 3 มาวัดค่าความหนืดพบว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร มีค่าความหนืดสูงที่สุดซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับค่าความหนืด คือถ้าความหนืดสูงสีเข้ม ความหนืดต่ำสีจาง ส่วนการทดลองที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ความหนืดมีค่าใกล้เคียงกันมากแต่ที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร มีความหนืดสูงกว่าที่

ระยะทาง 30 เซนติเมตร ซึ่งต่างจากการทดลองที่ผ่านมาทั้ง 2 การทดลอง เนื่องมาจากที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร ของการทดลองที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาในการสลายเซลล์ด้วยด่างเพียงแค่ 0.94 วินาที จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้การสลายเซลล์ด้วยด่างเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 2 วินาที ทำให้การสลายเซลล์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ส่วนที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร ใช้เวลา 188 วินาที เซลล์สลายได้สมบูรณ์มากกว่าทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมามากกว่าความหนืดที่ได้จึงสูงกว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร จากการทดลองที่ผ่านมาทั้ง 3 การทดลองในการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ พบว่าระยะทางการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่เพิ่มขึ้น เวลาสลายเซลล์ด้วยด่างแก่เพิ่มขึ้นและอัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ที่สูงขึ้นมีผลทำให้ความหนืดลดลง เพราะดีเอ็นเอเป็นโพลีเมอร์ดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ เนื่องจากระยะทางยาวขึ้นเวลาที่ดีเอ็นเอถูกด่างทำลายนานขึ้น และอัตราการไหลที่สูงขึ้นทำให้แรงเฉือนของ In-Line Static Mixer ในท่อสูงขึ้นด้วยมีผลทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลงค่าความหนืดจึงลดลง นอกจากนี้สีที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับค่าความหนืด คือสีผสมเข้มค่าความหนืดสูง สีผสมจางค่าความหนืดต่ำ

ช่วงการทำให้ lysate เป็นกลางที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125 และ 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า shear stress จะขึ้น ๆ ลง ๆ เพราะในการวัดค่าความหนืดจะต้องไม่มีของแข็งเจือปนสารผสมต้องเป็นเนื้อเดียวกันแต่ neutralised suspension ที่ได้จากการทำให้ lysate เป็นกลางจะมีของแข็งพวกเศษเซลล์แขวนลอยอยู่ในของเหลวเมื่อนำไปวัดความหนืดค่าที่ได้มาจึงไม่คงที่แต่เมื่อเพิ่มอัตราแรงเฉือนไปถึงจุดจุดหนึ่งค่าความหนืดเริ่มจะคงที่ เพราะ lysate เริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามอัตราแรงเฉือน ส่วนการทดลองที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าความหนืดที่วัดได้ทั้ง 3 ระยะทางเมื่ออัตราแรงเฉือนเพิ่มขึ้นค่าความหนืดของ neutralised suspension จะลดลงและมีลักษณะเป็นเส้นตรงในระดับเดียวกันซึ่งเป็นคุณสมบัติของของเหลวในอุดมคติ หรือที่เรียกว่าการไหลแบบ newtonain แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะทางเพิ่มขึ้นและอัตราการไหลที่สูงขึ้นมีผลทำให้ค่าความหนืดของเซลล์ลดลง เพราะดีเอ็นเอและส่วนที่เป็นเศษเซลล์ถูกแรงเฉือนจาก In-Line Static Mixer เป็นเวลานานและรุนแรงทำให้ดีเอ็นเอขาดเป็นท่อน ๆ มากกว่าอัตราการไหลที่ต่ำกว่าเปรียบเสมือนกับรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อนำมาวัดค่าความหนืดค่าที่ได้จะมีลักษณะคงที่ซึ่งจากการทดลองของ Ciccolini et al (1998) และ Chamsart (2001) พบว่าการทำให้ lysate เป็นกลาง lysate จะเริ่มแขวนลอยด้วยการตกตะกอน

เศษเซลล์และ ความหนืดต่ำมากประมาณ 2-3 มิลลิปาสคาลวินาที ซึ่งสัมพันธ์กับการทดลองที่อัตราการไหล ของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที จากกราฟแสดงค่าความหนืดที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร มีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 2-3 มิลลิปาสคาลวินาที

5.2 การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องประกอบการใช้ถังกวน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับอัตราแรงเฉือนที่อัตราการไหล 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าช่วงระยะเวลาการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่นาทีที่ 2, 5 และ 10 เมื่อเพิ่มอัตราแรงเฉือนมากขึ้นค่าความหนืดจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ซึ่งนาทีที่ 10 จะมีค่าความหนืดต่ำที่สุด เพราะระยะเวลาในการสลายเซลล์นานดีเอ็นเอจะถูกแรงเฉือนจากใบพัดเป็นเวลานานทำให้ดีเอ็นเอถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือ เสียสภาพความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้ก็จะลดลงค่าความหนืดที่วัดได้จึงลดลงด้วย ส่วนช่วงระยะเวลาการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที เมื่อเพิ่มอัตราแรงเฉือนมากขึ้น ค่าความหนืดจะลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งความหนืดที่ได้ค่อนข้างจะคงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อย โดยที่ค่าความหนืดทั้ง 3 ระยะเวลานี้จะใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วงประมาณ 2-3 เท่าของความหนืดของน้ำและเริ่มเป็นเส้นตรงในระดับเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าค่าความหนืดที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที นี้มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรงซึ่งเป็นคุณสมบัติของของเหลวในอุดมคติคือ ที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ ที่ของไหลมีค่าความหนืดเป็นค่าคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามอัตราแรงเฉือนหรือความเร็วในการกวนของใบพัด สอดคล้องกับการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer ช่วงแรกของอัตราแรงเฉือนช่วงนาทีที่ 30 ค่าความหนืดที่วัดได้จะต่ำกว่า นาทีที่ 2 และ 5 เมื่ออัตราแรงเฉือนประมาณ 150 ต่อวินาทีค่าความหนืดที่วัดได้ของระยะเวลาทั้ง 3 จะเริ่มคงที่เป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ ๆ เหลวในอุดมคติ (newtonian fluid)

5.3 การสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับอัตราแรงเฉือนที่อัตราการกวนของใบพัด 200 รอบต่อวินาทีที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที พบว่าความหนืดที่ระยะเวลา 2 นาทีมีค่าความหนืดสูงกว่าที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที ตามลำดับ เพราะระยะเวลามากขึ้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือเสียสภาพ เนื่องจากถูกแรงเฉือนของใบพัดและด่างทำลายนานขึ้นทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลง ดังนั้นความหนืดที่ได้จึงลดลง ส่วนในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลาง พบว่าตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ความหนืดทั้ง 3 ระยะเวลานี้จะใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วงประมาณ 2-3 มิลลิปาสคาลวินาที ของความหนืดน้ำ

และเริ่มเป็นเส้นตรงในระดับเดียวกันแสดงให้เห็นว่าที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรงซึ่งเป็นคุณสมบัติของของเหลวในอุดมคติ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทำให้ lysate เป็นกลางภายในท่อ และการทำให้ lysate เป็นกลางผ่านท่อก่อนลงถังกวนจากการทดลองที่ผ่านมาแล้วข้างต้น

5.4 เปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 วิธี

จากการศึกษาพบว่าวิธีการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้ lysate เป็นกลางแบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer เป็นวิธีที่ดีที่สุดที่สามารถสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ในปริมาณที่สูงกว่า วิธีการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องประกอบกับการใช้ถังกวน และวิธีการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน ตามลำดับ เพราะการผสมของสารผสมเป็นไปอย่างรวดเร็วทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอเกิดการเสียหายน้อย และสารผสมทำปฏิกิริยากันได้อย่างสมบูรณ์ สามารถทำได้อย่างต่อเนื่องต้นทุน อุปกรณ์ที่ใช้ถูกกว่าการใช้ถังกวนอย่างมาก และการกวนโดยใช้ใบพัดอย่างเดียวอาจก่อให้เกิด "hot spot" คือการที่สารละลายด่างสะสมอยู่เฉพาะจุด เพราะการกวนส่วนผสมไม่มีประสิทธิภาพและการตกสู่ก้นถังของ neutralised buffer เนื่องจากการกวนไม่ดีพอ

สรุปผลการศึกษา

1. สภาวะอัตราการไหลที่เหมาะสมในการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องใน In-Line Static Mixer ของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลางเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E. coli* pTX 0161 คือ 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางใน In-Line Static Mixer ประมาณ 2 และ 1.5 วินาที ตามลำดับ

3. ระยะทางที่เหมาะสมในการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องใน In-Line Static Mixer ของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลางเพื่อผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอคือ 30 เซนติเมตร ในช่วงการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ และ 60 เซนติเมตร ในช่วงการทำให้ lysate เป็นกลาง

4. ระยะทางในการสลายเซลล์ ระยะเวลาในการสลายเซลล์และอัตราการไหลของสารมีส่วนสำคัญมากต่อปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ

5. การสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer และการทำให้ lysate เป็นกลางร่วมกับการใช้ถังกวน ช่วงการสลายเซลล์ด้วยด่างระยะเวลาที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิต พลาสมิดสูงที่สุดอยู่ในช่วงระยะเวลา 5 นาที หลังจาก 5 นาที ปริมาณพลาสมิดที่ได้จะเริ่มลดลง ส่วนช่วง

การทำให้ lysate เป็นกลางระยะเวลาที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตพลาสมิดสูงที่สุดอยู่ในช่วงระยะเวลา 15 นาที แต่ระยะเวลาไม่เกิน 30 นาที ก็ให้ผลผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน

6. การสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวนจะให้ผลที่เหมือนกับการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer และการทำให้ lysate เป็นกลางแบบต่อเนื่องร่วมกับการใช้ถังกวน แต่ปริมาณพลาสมิดที่ได้ในช่วงการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่จะให้ผลผลิตที่ต่ำกว่า แบบการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer ส่วนช่วงการทำให้ lysate เป็นกลางจะให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน

7. การสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer และการกรอง ให้ผลผลิตที่สูงกว่าการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer ที่ไม่ผ่านเครื่องกรอง

8. การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่เมื่อระยะทางในการสลายเซลล์มากขึ้นค่าความหนืดที่วัดได้จะลดลง ส่วนขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางเมื่อระยะทางเพิ่มขึ้นค่าความหนืดที่วัดได้จะลดลงและเริ่มคงที่เป็นเส้นตรงในระดับเดียวกันทั้ง 3 ระยะทาง

9. อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที จะมีค่าอัตราความหนืดต่ำที่สุดเมื่อเปรียบกับอัตราการไหลที่ 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ทั้งช่วงการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และช่วงการทำให้ lysate เป็นกลาง

10. ค่าความหนืดของ neutralised suspension ในทุกการทดลองมีคุณสมบัติเป็นของเหลวในอุดมคติ (newtonain) มีความหนืดอยู่ในช่วง 2-3 มิลลิปาสคาลวินาที

11. จากผลการศึกษาการสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer เป็นวิธีที่ดีที่สุด คือให้ผลผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอสูงที่สุดและต้นทุน อุปกรณ์ที่ใช้ถูกกว่าการใช้ถังกวนเป็นอย่างมากสามารถทำได้แบบต่อเนื่อง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการขยายขนาดโรงงานต้นแบบ

2. ศึกษาวิธีการกรองแบบต่อเนื่องให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

3. ปรับปรุงขั้นตอนและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสลายเซลล์ให้เป็นระบบและมีประสิทธิภาพมากขึ้น และออกแบบระบบควบคุมต่าง ๆ ให้สามารถควบคุมได้อัตโนมัติ

4. ทำการวิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ว่ามีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปใช้ในการรักษายีนหรือ การรักษาทางด้านมะเร็งต่อไป

ตารางที่ 5-1 สรุปผลรวมปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอของการทดลองทั้งหมด (ภาคผนวก ฌ)

การทดลอง	ขั้นตอน	ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ (mg/gcwt)				
การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Stataic Mixer	การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่	ระยะทาง (เซนติเมตร)				
		control	30	60	90	
	125: 250	7.19	9.68	8.97	8.57	
	250: 500	7.19	9.83	8.81	7.88	
	500: 1,000	7.19	7.54	7.98	7.47	
	การทำให้ lysate เป็นกลาง	control	30	60	90	
	375: 125	7.19	10.85	10.34	9.50	
	750: 250	7.19	10.48	10.70	10.09	
	1,500: 500	7.19	5.70	7.27	6.26	
การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Stataic Mixer และถังกวน	การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่	ระยะเวลา (นาที)				
		control	2	5	10	
		6.01	7.33	7.33	6.97	
	การทำให้ lysate เป็นกลาง	control	5	15	30	
		6.01	6.96	7.29	6.96	
การสลายเซลล์แบบต่อเนื่องในถังกวน	การสลายเซลล์ด้วยด่างแก่	ระยะเวลา (นาที)				
		control	2	5	10	
		6.01	6.66	6.66	6.30	
	การทำให้ lysate เป็นกลาง	control	5	15	30	
		6.01	7.65	7.29	6.90	
การสลเซลล์ผ่าน In-Line Stataic Mixer และการกรอง	การทำให้ lysate เป็นกลาง	ระยะทาง (เซนติเมตร)				
		control	30	60	90	**การกรอง**
		6.83	7.00	5.98	6.03	7.09