การสลายเซลล์ด้วยด่างอย่างต่อเนื่องผ่านท่อผสมที่ไม่มีการกวนเพื่อผลิตพลาสมิดสำหรับยีนบำบัด

ธัญวัฒน์ กาญจนศร

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤศจิกายน 2548

ISBN 974-50265-57-3

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัย

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ธัญวัฒน์ กาญจนศร ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวภา ไหวพริบ)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวภา ไหวพริบ)

.....กรรมการ

(ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประทุม ม่วงมี)

วันที่ 15 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2548

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิจัยนี้ได้รับทุนจากโครงการวิจัยงบประมาณรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ ปี 2546
ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา
จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2548

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยลงได้เพราะ ได้รับความอนุเคราะห์จากหลาย ๆ ท่าน ผู้เขียนต้องกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ประธานอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งคอยให้คำแนะนำทั้งในทางวิชาการ การแก้ไขสิ่งบกพร่องต่าง ๆ และการชักนำให้มีความมุมานะทำงานเมื่อยามที่งานมีข้อติดขัด ผู้เขียนขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวภา ไหวพริบ ขอขอบคุณ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร ซึ่งเป็นคณะกรรมการร่วมสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบและชี้แนะเพื่อการแก้ไขวิทยานิพนธ์ขอบใจพี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อน ๆ ในกลุ่มวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี (BBERG) ได้แก่ พี่เตย น้องเจี๊ยบ ส้ม ยุ้ย แก้ว ลลิต กิ๊ก ที่มีส่วนร่วมในการช่วยทำงาน ขอขอบพระคุณภาควิชา ชีววิทยา จุลชีววิทยา และชีวเคมี ที่สนับสนุนห้องปฏิบัติการทดลองที่คอยช่วยเหลือในการเบิกยืมเครื่องมือวิทยาศาสตร์ รวมทั้งคุณรุ่งทิพย์ โพล้งเศรษฐี และ คุณอรุณนีย์ เนื้อแก้ว เจ้าหน้าที่จากโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการขอใช้ห้องเครื่องมือ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย โครงการวิจัยการสลายเซลล์และโครงการวิจัยสลายแป้งมันที่สนับสนุนทุนงบประมาณวิจัยในโครงการครั้งนี้ รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องที่มีส่วนสนับสนุนทุก ๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามต้องขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ท้ายสุดนี้ต้องขอกราบแทบเท้าคุณพ่อและ คุณแม่ที่ให้การสนับสนุน ทุ่มเท ทั้งในด้านทุนทรัพย์ คำปรึกษาและกำลังใจทำให้สามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่าง ๆ ไปด้วยดี ขอบพระคุณพี่ชาย และ ญาติพี่น้องทุกคน ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ธัญวัฒน์ กาญจนศร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

45911882: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
คำสำคัญ: การสลายเซลล์/ IN-LINE STATIC MIXER/ ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน/ การกรอง

ธัญวัฒน์ กาญจนศร: การสลายเซลล์ด้วยด่างอย่างต่อเนื่องผ่านท่อผสมสารที่ไม่มีการกวนเพื่อผลิตพลาสมิดสำหรับยีนบำบัด (CONTINUOUS ALKALINE – CELL LYSIS THROUGH IN – LINE STATIC MIXER FOR THE PRODUCTION OF pDNA FOR GENE THERAPY) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, Ph.D., ศิริโฉม ทุ่งเก้า, Ph.D., เยาวภา ไหวพริบ, Ph.D. 146 หน้า. ปี พ.ศ. 2548. ISBN 974-50265-57-3

ปฏิกรณ์แบบท่อที่ไม่มีการเคลื่อนไหวถูกประดิษฐ์ขึ้นเพื่อใช้สลายเซลล์ *E. coli* pTX0161 และทำให้ lysate เป็นกลางเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเออย่างต่อเนื่องอย่างมีประสิทธิภาพ เซลล์ถูกสลายด้วยด่างเข้มข้นผสม 1% SDS และ lysate ถูกทำให้เป็นกลางด้วยอัตราการไหลของเซลล์แขวนลอย: สารละลายสำหรับสลายเซลล์: สารละลายที่ทำให้ lysate เป็นกลาง ที่อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 125: 250: 125 มิลลิลิตรต่อนาที 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที จากการทดลองพบว่าความหนืดของ lysate และขนาดของเศษเซลล์ในขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางลดลงและความหนาแน่นของเศษเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะทางและอัตราการไหลเพิ่มขึ้น ผลผลิตของพลาสมิดที่ดีได้จากการทำงานที่อัตราการไหล 125: 250:125 มิลลิลิตรต่อนาที 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทางของท่อไม่เกิน 0.6 เมตร การกวนผสมที่ไม่ดีและผลผลิตพลาสมิดต่ำนั้นได้จากที่อัตราการไหล และ 500:1,000:500 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากระยะเวลาในการทำงานน้อยกว่า 2 วินาที และที่ระยะทางของท่อเกิน 0.6 เมตร ของทุกการทดลอง เพื่อทดสอบว่า In-Line Static Mixer ทำงานร่วมกับการใช้ถังกวนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดพลาสมิดหรือไม่ โดยทำการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer จากนั้นสลายต่อในถังกวนแล้วตามด้วยการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวนเช่นกัน ผลปรากฏว่า In-Line Static Mixer เพียงอย่างเดียวสามารถใช้สลายเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนการสลายเซลล์โดยการใช้ถังกวนเพียงอย่างเดียวก็ได้มีการทดลองด้วยทั้งสามวิธีนี้พบว่าการสลายเซลล์และการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer เป็นวิธีที่ให้ผลดีที่สุด เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดพลาสมิดต่อไปได้มีการศึกษาโดยการติดตั้งระบบการกรองเข้าที่ปลายของ In-Line Static Mixer ต่อจากสิ้นสุดขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางเพื่อกรองเศษเซลล์ ปรากฏว่าให้ผลดีคือให้ปริมาณพลาสมิดสูงกว่าที่ไม่มีการกรอง การประดิษฐ์นี้ให้ผลดีและมีศักยภาพสำหรับการผลิตพลาสมิดในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้สำหรับทำยีนบำบัดต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

45911882: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)
KEYWORDS: CELL LYSIS/ IN-LINE STATIC MIXER/ BIOREACTOR/ FILTRATION
TUNYAWAT KARNJANASORN: CONTINUOUS ALKALINE-CELL LYSIS THROUGH IN-LINE STATIC MIXER FOR THE PRODUCTION OF pDNA FOR GENE THERAPY. THESIS ADVISORS: SAETHAWAT CHAMSART, Ph.D., SIRIGHOM THUNGKAO, Ph.D., YAOWAPA WAIPRIB, Ph.D. 146 P. 2005. ISBN 974-50265-57-3

An In-Line Static Mixer (ISM) was invented to lyse *E. coli* pTX0161 cells and to neutralise the cell lysate continuously and efficiently for the extraction of plasmid DNA (pDNA). Cells were lysed using concentrated alkaline with 1% SDS and the lysate was neutralised at feeding rates of cell suspension: lysis solution: neutralisation solution of 125: 250: 125 mL/min, 250: 500: 250 mL/min, and 500: 1000: 500 mL/min. Lysate viscosity decreased as distances and feeding rates increased. Good plasmid yields were obtained from both lysis and neutralisation at the feeding rate ratios of 125: 250: 125 mL/min and 250: 500: 250 mL/min within mixing distances $\leq$ 0.6 m. Poor mixing performance and plasmid yield were obtained at a high feeding rate of 500: 1000: 500 mL/min because the residence reaction times were less than 2 s and the mixing distances $\geq$ 0.6 m at all feeding rates. Whether cell lysis using In-Line Static Mixer together with a stirred tank enhanced cell lysis, cells also were lysed through the In-Line Static Mixer and then the lysis was continued in a stirred tank and followed by neutralisation in the same tank. Result showed that only In-Line Static Mixer was sufficient for complete cell lysis. Cell lysis and lysate neutralisation in the stirred tank, without using In-Line Static Mixer, was also carried out. Among those methods, cell lysis and lysate neutralisation through In-Line Static Mixer showed superb performance and plasmid yield over the other two methods. For further development of the plasmid extraction process, a filtration unit was integrated at the end of the In-Line Static Mixer following neutralisation step in order to separate neutralised flocs. With this system, a high plasmid yield was obtained. This invention showed excellent performance with scaleable potential for the commercial manufacture of pDNA for gene therapy.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

สมมติฐานของการวิจัย..... 4

ขอบเขตของการวิจัย..... 4

สถานที่ทดลอง..... 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

ยีนบำบัด (gene therapy)..... 6

พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA)..... 10

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ (fermentation)..... 11

ปฏิกรณ์การสลายเซลล์แบบถังกวน (bioreactor)..... 13

การสลายเซลล์ (cel lysis)..... 16

static mixers..... 19

รีโอโลยี (rheology)..... 27

โครมาโตกราฟี..... 31

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 31

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	38
4	ผลการทดลอง	47
	การผลิตเซลล์	47
	ส่วนประกอบและการทำงานของชุด In-Line Mixer	48
	การสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใน In-Line Static Mixer	51
	การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่อง ร่วมกับการใช้ถังกวน	74
	การสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน	80
	การสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In-Line Static Mixer ตามด้วยการกรองอย่างต่อเนื่อง	86
5	อภิปรายสรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	89
บรรณานุกรม		99
ภาคผนวก		103
	ภาคผนวก ก สารเคมีสำหรับใช้ในการสลายเซลล์	103
	ภาคผนวก ข สารเคมีใช้ทำเจล อิเลคโตรโฟรีซิส	104
	ภาคผนวก ค อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	105
	ภาคผนวก ง วิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์	109
	ภาคผนวก จ ผลการทดลองการผลิตเซลล์	115
	ภาคผนวก ฉ การหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและ การคำนวณปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้	130
	ภาคผนวก ช งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์	138
	ภาคผนวก ซ ผลการทดสอบทางสถิติ	139
	ภาคผนวก ฌ วิธีการคำนวณปริมาณพลาสมิดและค่า Re	143
ประวัติย่อของผู้วิจัย		146

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 อัตราการไหลสารต่าง ๆ เข้าระบบ In-Line Mixer..... 43

4-1 แสดงการทดลองการสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใน In-Line Static Mixer..... 51

4-2 อัตราไหลของสารทั้งสองที่ผสมกัน และอัตราเร็วขณะการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer ที่สภาวะต่างกัน..... 60

4-3 อัตราไหลของสารทั้งสองที่ผสมกัน และอัตราเร็วขณะการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer ที่สภาวะต่างกัน..... 62

4-4 ค่า Re ที่อัตราการไหลของ lysate ที่ระยะทางต่าง ๆ กัน..... 65

4-5 ค่า Re ที่อัตราการไหลของ neutralised suspension ที่ระยะทางต่าง ๆ กัน..... 68

5-1 สรุปผลรวมปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอของการทดลองทั้งหมด..... 98

ภาคผนวก ฉ. 1 การหาความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอจากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่คำนวณได้..... 130

ภาคผนวก ฉ. 2 การหาความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอจากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ประกอบกับการใช้ถังกวน และการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องในถังกวนที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณพลาสมิด4 ดีเอ็นเอที่คำนวณได้..... 135

ภาคผนวก ฉ. 3 การหาความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอจากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer และการกรองแบบต่อเนื่องที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่คำนวณได้..... 137

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร..... 14

2-2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร..... 15

2-3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนสำหรับใช้ในการสลายเซลล์ขนาด 10 ลิตร..... 16

2-4 รูปแบบต่าง ๆ ไส้ (element) ของ static mixer..... 20

2-5 Static elements ที่ถูกสอดใส่ไว้ในท่อ..... 21

2-6 การไหลของสารตามแบบของการใช้ static element ชนิด kenic..... 23

2-7 ลักษณะของ static mixer แบบ monotube heat exchanger..... 25

2-8 ลักษณะของ static mixer แบบ multitube heat exchanger..... 25

2-9 ลักษณะของไส้ static element ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้..... 26

2-10 ลักษณะของไส้ static element ที่ใส่ไว้ภายในท่อแก้ว..... 26

2-11 ลักษณะแรงที่กระทำต่อพื้นที่ในลักษณะต้านการไหลของสาร..... 28

2-12 ลักษณะการไหลของของไหล (flow curve)..... 30

3-1 การออกแบบ In-Line Static Mixer สำหรับการสลายเซลล์แบคทีเรียเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ..... 41

4-1 ชุด In-Line Static Mixer ที่ใช้งานการสลายเซลล์สำหรับการทดลอง..... 50

4-2 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที..... 53

4-3 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375:125 มิลลิลิตรต่อนาที..... 53

4-4 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที..... 54

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-5 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที..... 55

4-6 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที..... 56

4-7 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที..... 56

4-8 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 125: 250, 250: 500 และ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที..... 59

4-9 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที..... 59

4-10 ระยะทางสีผสมของ lysate ที่อัตราการไหลต่าง ๆ กันที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร..... 60

4-11 ระยะทางสีผสมของ lysate ที่อัตราการไหลต่าง ๆ กันที่ระยะทาง 90 เซนติเมตร และสีผสมของ neutralised suspension ที่อัตราการไหลต่าง ๆ กันที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร..... 61

4-12 shear stress กับ shear rate ของ lysate ที่ระยะทางต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่แบบต่อเนื่องใน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ (a) 125: 250, (b) 250: 500 และ (c) 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที..... 66

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-13 ความหนืดของ lysate ที่ระยะทางต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่แบบต่อเนื่องใน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ (a) 125: 250, (b) 250: 500 และ (c) 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที..... 66

4-14 shear stress กับ shear rate ของ neutralised suspension ที่ระยะทางต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางต่อเนื่องใน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง (a) 375: 125, (b) 750: 250 และ(c) 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที..... 69

4-15 ความหนืดของ neutrlised suspension ที่ระยะทางต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางใน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง (a) 375: 125, (b) 750: 250 และ (c) 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที..... 69

4-16 เศษเซลล์ที่เกิดจากการทำให้ lysate เป็นกลางที่อัตราการไหลต่าง ๆ กันที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร..... 70

4-17 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้เปรียบเทียบกับ marker λDNA/*Eco*RI + HindIII..... 71

4-18 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้เปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I..... 73

4-19 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ที่ระยะเวลาต่าง ๆ..... 75

4-20 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลาต่าง ๆ..... 75

4-21 shear stress กับ shear rate ของ lysate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวน..... 76

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-22 ความหนืดของ lysate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวน..... 77

4-23 shear stress กับ shear rate ของ neutralised suspension ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวน..... 78

4-24 ความหนืดของ neutralised suspension ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวน..... 78

4-25 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้เปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I..... 79

4-26 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ในถังกวน ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน..... 81

4-27 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนในขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน..... 81

4-28 shear stress กับ shear rate ของ lysate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ในถังกวน..... 82

4-29 ความหนืดของ lysate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ในถังกวน.... 83

4-30 shear stress กับ shear rate ของ neutralised suspension ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน..... 84

4-31 ความหนืดของ neutralised suspension ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน..... 84

4-32 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้เปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I..... 85

4-33 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ใน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องในขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ และที่ผ่านการกรอง..... 87

4-34 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้เปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I..... 88

ภาคผนวก 1 แสดงค่า O.D. ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร..... 115

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ภาคผนวก 2 แสดงค่า O.D. ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* PTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 116

ภาคผนวก 3 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร..... 117

ภาคผนวก 4 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 117

ภาคผนวก 5 แสดงค่า LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 118

ภาคผนวก 6 แสดงค่า LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร..... 118

ภาคผนวก 7 แสดงค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร..... 119

ภาคผนวก 8 แสดงค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 119

ภาคผนวก 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 1..... 121

ภาคผนวก 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2..... 121

ภาคผนวก 11 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 1..... 123

ภาคผนวก 12 แสดงค่า LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2..... 123

ภาคผนวก 13 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2..... 124

ภาคผนวก 14 แสดงค่า LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2..... 124

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ภาคผนวก 15 แสดงค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวใน ถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 1..... 125

ภาคผนวก 16 แสดงค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2..... 125

ภาคผนวก 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 127

ภาคผนวก 18 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 127

ภาคผนวก 19 แสดงค่า LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 128

ภาคผนวก 20 แสดงค่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 129

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University