

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาแบ่งออกเป็น 8 หัวข้อ ได้แก่

1. ยีนบำบัด (gene therapy)
 - 1.1 cancer therapy
 - 1.2 DNA vaccine
2. พลาสมิดดีเอ็นเอ (pDNA)
3. การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ
 - 3.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture)
 - 3.2 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture)
 - 3.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)
4. ปฏิกรณ์การสลายเซลล์แบบถังกวน (lysis reactor)
5. การสลายเซลล์ (cell lysis)
6. static mixer
7. รีโวลยี (rheology)
8. โครมาโทกราฟี (chromatography)
9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยีนบำบัด (gene therapy)

ยีนบำบัด หมายถึงการรักษาโรคหรือความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม โดยการตัดเปลี่ยนยีนส่อดใส่ยีนที่ปกติเข้าไปแทนที่ หรือใส่ยีนที่ปกติเข้าไปโดยไม่ต้องเอายีนที่ผิดปกติออก (Vile, 1997) การรักษาโรคทางพันธุกรรมโดยวิธีนี้จะใช้หลักการคือ ถ้าเซลล์ขาดหรือมีความผิดปกติที่ยีนตัวใดก็สามารถที่จะใส่ยีนที่ปกติเข้าไปในเซลล์นั้น ถือเป็นการแก้ไขที่สาเหตุโดยตรง

ปัจจัยสำคัญของการทำยีนบำบัดเพื่อบรรลุนเป้าหมายอย่างแท้จริง แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ (1) วิธีการนำยีนพาหะไปยังเซลล์เป้าหมาย (2) ความจำเพาะเจาะจงของเซลล์พาหะที่มีปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมายและ (3) การควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างเฉพาะเจาะจงภายในเซลล์ (Vile, 1997)

หลักการทำยีนบำบัด

โดยทั่วไปเริ่มจากการคัดเลือกไวรัสที่เหมาะสมในการเป็นพาหะมาดัดแปลงนำยีนส่วนที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำยีนที่ดีซึ่งเป็นยีนที่จะผลิตโปรตีนตามที่ต้องการใส่แทนที่เข้าไปในไวรัส แล้วนำไวรัสดังกล่าวถ่ายใส่ให้กับผู้ป่วย ไวรัสดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นพาหะให้ยีนที่เราต้องการอาศัยฟงติดเข้าไปในเซลล์ของร่างกายผู้ป่วย เมื่อยีนดังกล่าวเข้าไปในเซลล์แล้ว กระบวนการสร้างโปรตีนจะเริ่มทำงาน โดยเริ่มมีการผลิตโปรตีนชนิดดีที่ผู้ป่วยต้องการออกมาทดแทนยีนที่ผิดปกติ (Vile, 1997)

พาหะ (vector) ที่ใช้ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม

ก. การใช้ไวรัสเป็นพาหะ ได้แก่ (1) retrovirus เป็นไวรัสประเภท RNA virus สามารถแทรกสอดสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าระหว่างจีโนมของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพิ่มจำนวนลูกหลาน ส่วนยีนที่ถ่ายฝากเข้าไปจะยังคงอยู่ด้วยเสมอ (2) adenovirus เป็นไวรัสประเภท DNA virus ไวรัสประเภทนี้จะไม่เข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมของคนและสัตว์ แต่จะค้างอยู่ในนิวเคลียสได้เป็นเวลานานเท่าที่เซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ จึงน่าสนใจว่าเมื่อรู้ว่ายีนใดทำหน้าที่อะไร สามารถจะทดลองดัดแปลงตัดข้อมูลบางส่วนออก เพื่อพัฒนาให้ไวรัสเป็นตัวขนส่งยีนได้ และสามารถเข้าไปทำงานได้ในเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวและ (3) adeno-associated viruses (AAV) เป็นไวรัสประเภท single-stranded DNA virus คือ AAV ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ ต้องอาศัยการติดเชื้อของ adenovirus หรือ herpesvirus รวมอยู่ในเซลล์เดียวกัน ไวรัสจึงสามารถจำลองตัวเองได้ จีโนมของ AAV สามารถเข้าไปแทรกสอดในโครโมโซมของเซลล์นั้นตรงตำแหน่งเฉพาะเจาะจง คือ โครโมโซมคู่ที่ 19 การที่ AAV เข้าไปแทรกสอดอย่างเฉพาะเจาะจงนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้ (Mulligan, 1993)

ข. การใช้ไลโปโซม (liposome) เป็นกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ซึ่งเมื่อนำมารวมกับดีเอ็นเอเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่สามารถจะแทรกเข้าไปภายในผนังเซลล์ได้ดี เนื่องจากผนังเซลล์ของสัตว์เป็นกรดไขมัน วิธีนี้ทำให้ดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพแม้ว่าจำนวนหนึ่งจะผ่านผนังเซลล์ไปแล้ว แต่บางส่วนเท่านั้นที่จะผ่านเข้าไปจนถึงนิวเคลียสและมีเพียงส่วนน้อยมากที่จะเข้าไปแทรกในโครโมโซมเพื่อจะถ่ายทอดไปกับการแบ่งตัวของเซลล์ได้ ดังนั้นยีนที่ใส่เข้าไปโดยวิธีนี้จึงทำงานได้เป็นเพียงเวลาไม่นาน

ค. พลาสมิดดีเอ็นเอ พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมมีขนาดเล็ก สามารถเพิ่มจำนวนได้สูงถึง 3,000 ชุด ในแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ recombinant plasmid สามารถสร้างได้โดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อที่จะใส่ยีนที่ต้องการ ดังนั้นทำให้ได้จำนวนชุดของยีนหลายพันชุด ยีนที่ใส่เข้าไปนี้อาจเป็นยีนที่ใช้รักษาโรคพันธุกรรม เช่น ยีนฆ่าเซลล์มะเร็ง หรือ ยีนสร้าง

วัคซีน และเมื่อนำยีนที่มีคุณสมบัติในการรักษา (therapeutic gene) เข้าสู่สิ่งมีชีวิต (คน หรือสัตว์) จะทำให้สามารถรักษาความผิดปกติหรือโรคบางอย่างได้ วิธีการดังกล่าวซึ่งเป็นการทำยีนบำบัดโดยตรงการใช้พลาสมิดทำได้ง่ายโดยการฉีด พลาสมิดดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการทำยีนบำบัดโดยการใช้พลาสมิดเป็นตัวพาเป็นเทคโนโลยีล่าสุดในการพาที่ยีนที่ไม่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ (non-viral gene delivery system) ซึ่งใช้ง่าย ผลิตได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตและใช้ไวรัส และในการใช้ไวรัสเป็นพาหะสามารถก่อให้เกิดการต่อต้านเมื่อใช้ในครั้งต่อ ๆ ไปเพราะร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน (Niew et al., 1998)

การถ่ายฝากยีน (gene transfer) เข้าสู่ภายในเซลล์

สามารถทำได้ 2 แบบ คือ การถ่ายฝากยีนทางตรง (*in vivo*) คือ การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์ภายในร่างกายโดยตรง ซึ่งเป็นการเจาะเจาะจงต่อโรคของผู้ป่วย และ การถ่ายฝากยีนทางอ้อม (*ex vivo*) คือการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เป้าหมาย แล้วนำมาเพาะเลี้ยงนอกในร่างกาย แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนที่แก้ไขแล้วถ่ายกลับคืนสู่ร่างกายผู้ป่วย (Marquet, Horn & Meek, 1995)

อุปสรรคในการทำยีนบำบัด

ยีนที่ให้แก่ผู้ป่วยถูกทำลายโดยภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันเกิดจดจำส่วนประกอบของเชื้อไวรัสที่ใช้เป็นพาหะได้เมื่อยีนถูกทำลายเร็ว จึงต้องให้ยีนแก่ผู้ป่วยบ่อยครั้งประสิทธิภาพของการถ่ายฝากยีนเข้าไปในเซลล์ยังต่ำและการผลิตอาร์เอ็นเอหรือโปรตีนของยีนไม่สามารถควบคุมได้ทั้งหมดหลังจากที่เข้าสู่ร่างกาย

1. cancer therapy

ในปัจจุบันโรคมะเร็งถือว่าเป็นโรคที่มนุษย์เราให้ความสนใจกันมากในวงการแพทย์ได้มีการนำยีนบำบัดเข้ามาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง หลักการของยีนบำบัดนั้นทำให้เกิดการนำไปประยุกต์ใช้ในโรคมะเร็งมากที่สุด เนื่องจากโรคมะเร็งเป็นโรคที่พบบ่อยมีปัญหในการรักษามาก และสามารถตัดเซลล์มะเร็งออกมาศึกษาวิจัยได้ง่าย เซลล์มะเร็งแบ่งตัวตลอดเวลาจึงไม่น่าจะมีปัญหา อาจแบ่งแนวทางของยีนบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1.1 การนำ tumor suppressor genes เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ tumor suppressor genes เช่น p53 gene, Rb gene เป็นต้น ดังนั้นการใส่ tumor suppressor gene ปกติกลับเข้าไปอาจจะทำให้เซลล์หยุดการเติบโตได้ แต่วิธีการทำได้ยากเพราะการนำยีนเข้าสู่เซลล์ให้ได้ทุกเซลล์ยากเกินไป เนื่องจากเซลล์มะเร็งโดยมากเกิดการกลายพันธุ์ของยีนหลายตำแหน่งพร้อมกันในเซลล์เดียวกัน การแก้ไขตำแหน่งเดียวอาจไม่เป็นหลักประกันที่ดีว่าเซลล์มะเร็งจะหยุดเจริญเติบโต

1.2 การนำ suicidal gene เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่แบ่งตัวเร็วกว่าเซลล์ปกติที่อยู่รอบข้าง ดังนั้นการอาศัยคุณสมบัติของไวรัสในการนำยีนที่เป็นพิษต่อเซลล์เข้าไปยังในเซลล์ที่แบ่งตัวโดยเฉพาะจึงอาจทำให้มีการเลือกทำลายเฉพาะเซลล์มะเร็งได้

1.3 การนำยีนเข้าสู่ tumor-infiltrating lymphocyte เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันมะเร็ง
หลายชนิดเมื่อมีการตัดออกมาตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่ามีเซลล์ lymphocyte ปะปนอยู่ในก้อนมะเร็ง เซลล์ lymphocyte เหล่านี้เรียกว่า tumor-infiltrating lymphocyte (TIL cells) ซึ่งเชื่อว่าเป็นปฏิกิริยาของร่างกายเพื่อจะกำจัดเซลล์มะเร็งโดยระบบภูมิคุ้มกันการที่มะเร็งไม่ถูกทำลายแม้ว่ามีเซลล์ lymphocyte ปะปนอยู่มากจะเป็นเพราะเซลล์มะเร็งมีวิธีการที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่รู้ว่ามันเป็นเซลล์ที่ผิดปกติ

1.4 การนำยีนเข้าสู่เซลล์มะเร็งเพื่อให้มีกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อต้านมะเร็งดีขึ้น
เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มีโมเลกุลที่จำเพาะต่อชนิดของเซลล์ (tumor-specific antigens) ซึ่งไม่มีในเซลล์ปกติของร่างกาย วิธีหนึ่งที่จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันรู้จัก tumor-specific antigens เหล่านี้คือการผ่าตัดเซลล์มะเร็งออกจากร่างกายและนำมาเพาะเลี้ยงไว้ เพื่อนำ cytokine genes ใส่เข้าไปในเซลล์มะเร็ง ตามด้วยการฉายรังสีเพื่อไม่ให้เซลล์แบ่งตัวได้อีก แล้วฉีดกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย เซลล์มะเร็งซึ่งได้รับการยีนเหล่านี้จะปล่อย cytokines ออกมาในตำแหน่งที่ฉีดเข้าสู่ร่างกายทำให้เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาทำความเข้าใจกับ tumor antigen และสร้างภูมิคุ้มกันที่รุนแรงขึ้นเพื่อหวังผลในการทำลายเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายในตำแหน่งอื่นไปแล้ว จึงเป็นแนวทางที่ได้รับการสนใจมากที่สุดแนวทางหนึ่งในการรักษามะเร็งด้วยยีน

2. DNA vaccine

การนำ DNA vaccine เป็นการฉีดวัคซีนโดยอาศัยดีเอ็นเอ (DNA-mediated vaccination) หรือ nucleic acid vaccine หลักการคือการฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าไปในเนื้อเยื่อของสัตว์ โดยใช้เข็มฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยตรงหรือโดย particle bombardment เป็นการอาศัยอนุภาคทองคำ ซึ่งเคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอและฉีดเข้าสู่ชั้นผิวหนังหรือชั้นหนังกำพร้าด้วยการยิงยีน (gene gun) ซึ่งเป็นกรรมวิธีในการนำดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ของสัตว์ต่อมาสัตว์สามารถสร้างโปรตีนจากดีเอ็นเอที่ฉีดเข้าเซลล์โปรตีนนี้ทำหน้าที่เสมือนแอนติเจน (antigen) ที่จะก่อให้เกิดภูมิคุ้มกัน ในลักษณะนี้วัคซีนดีเอ็นเอจะมีสภาพเหมือนกับการติดเชื้อไวรัส โดยที่เชื้อไวรัสจะเข้าไปในเซลล์ แล้วเกิดการรับรู้ว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกาย ทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันที่เกิดจาก B cell คือ immunoglobulin T helper และ CTL ข้อดีก็คือสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีโดยไม่

เพียงครั้งเดียวและสามารถทำให้แห้ง โดยวิธี lyophilised เพื่อให้คงสภาพและเก็บรักษาได้นาน โดยไม่ต้องแช่เย็น นอกจากนี้วัคซีนดีเอ็นเอยังสามารถสร้างสารได้หลายชนิดเพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อหลาย ๆ โรคในครั้งเดียวกันได้ รวมทั้งสามารถใส่รหัสพันธุกรรมของสารกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน เช่น interleukin, interferon เป็นต้น

การศึกษาความสามารถของวัคซีนดีเอ็นเอในการป้องกันโรคครั้งแรกเริ่มขึ้นกับสัตว์ทดลองต่อเชื้อไวรัส influenza ต่อมามีการศึกษาอีกหลายรายงาน พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง โดยศึกษาถึงวัคซีนต่อโรคต่าง ๆ พบว่าวัคซีนดีเอ็นเอมีข้อดีหลายอย่าง เช่น ง่ายต่อการสร้าง ทดสอบและผลิต สามารถใช้กับโรคชนิดต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งการรวมวัคซีนหลายโรคเข้าพร้อมกัน และความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด cellular mediated immunity ได้ดีมาก

มีรายงานพบว่ามีการใช้ DNA vaccine โดยการ clone G protein ของไวรัสใน expression พลาสมิดแล้วฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง พบว่าสัตว์ทดลองสามารถมีการตอบสนองทั้งการสร้าง แอนติบอดี (antibody) และ cell mediate immunity ด้วย DNA vaccine ยังอยู่ในระหว่างการทดลองซึ่งเชื่อว่าจะน่าจะเป็นวัคซีนที่ในอนาคตอันใกล้นี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่เป็นวงอยู่นอกโครโมโซม (double-stranded circular extrachromosome DNA) ที่สามารถทำให้เพิ่มจำนวนได้สูงถึง 3,000 ชุด ในแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ โดยปกติพลาสมิดจะมีขนาดเล็กสุดประมาณ 1.0 กิโลเบส และใหญ่ที่สุดมากกว่า 250 กิโลเบส พลาสมิดมีความสำคัญในการโคลนนิ่ง ขนาดของพลาสมิดที่เหมาะสมในการใช้โคลนนิ่งโดยขนาดที่ต้องการใช้เป็นพาหะ คือ 10 กิโลเบส การใช้พลาสมิดแต่ละขนาดในการโคลนนี้นั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของงานพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะมักใช้พลาสมิดประเภท relaxed ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีการจำลองตัวเองอิสระในปริมาณสูง ซึ่งเป็นลักษณะของพลาสมิดชนิดนี้ การจำลองตัวเองได้ในปริมาณสูงจะเป็นประโยชน์ สำหรับการผลิตพลาสมิดในการทำยีนบำบัด (Chamsart, 2001)

โครงสร้างพลาสมิดโดยทั่วไป สามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ supercoiled DNA โดยทั่วไป พลาสมิดชนิดนี้จะอยู่ในสภาพขดเป็นวงเพราะเป็นสภาพที่เสถียรมากที่สุดเหมาะสำหรับนำมาใช้ทำยีนบำบัด และสามารถเคลื่อนที่บนอะกาโรส (agarose gel) ได้เร็วที่สุด relaxed DNA เป็นพลาสมิดที่มีลักษณะเกลียวคู่ของดีเอ็นเอขาดเพียงเส้นใดเส้นหนึ่ง ทำให้คลายจากขดออกมา

ลักษณะเช่นนี้ทำให้สามารถเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลช้าที่สุด และ linear DNA เป็นลักษณะพลาสมิดที่เกลียวคู่ของดีเอ็นเอขาดออกทั้งสองเส้น ลักษณะเช่นนี้จะทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ปานกลาง

นอกจากนี้พลาสมิดยังมีความสำคัญเกี่ยวกับการสร้าง recombinant DNA คือการเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมาก สามารถสร้างได้โดยการใช้เทคนิคทางพันธุกรรมเพื่อที่จะใส่ยีนที่ต้องการ ดังนั้นทำให้ได้จำนวนชุดของยีนหลายพันชุด ยีนที่ใส่เข้าไปนี้อาจเป็นยีนที่ใช้รักษาโรคพันธุกรรม เช่น ยีนฆ่าเซลล์มะเร็ง หรือยีนสร้างวัคซีน และเมื่อนำยีนที่มีคุณสมบัติในการรักษาเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (คน หรือสัตว์) จะทำให้สามารถรักษาความผิดปกติหรือโรคบางอย่างได้ วิธีการดังกล่าวซึ่งเป็นการรักษาโดยใช้ยีนโดยตรง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ (cultivations) (Mcneil & Harvey, 1990)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรียให้ได้ปริมาณที่สูงสำหรับใช้ในการผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอ เพราะแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอขึ้นมาได้

1. การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) (สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ, 2538)

การเพาะเลี้ยงแบบกะ หมายถึงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่กำหนดปริมาตรเอาไว้แน่นอนในระยะเวลาที่เหมาะสมจุลินทรีย์จะเจริญภายใต้ภาวะที่กำหนดดังกล่าว ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการสะสมของของเสียที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายของจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์วิธีนี้มีการกำหนดปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเอาไว้ โดยที่อัตราการเจริญจะลดลงเรื่อย ๆ และมีแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากภาวะการขาดแคลนอาหาร และจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของของเสียและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จึงถือว่าการเพาะเลี้ยงแบบนี้ระบบจะมีลักษณะไม่คงที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (transient states) โดยทั่วไปสามารถแบ่งช่วงการเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบนี้ได้เป็น 6 ระยะคือ 1. ปรับตัว 2. การเจริญ 3. การเจริญเอกซ์โพเนนเชียล 4. การเจริญลด 5. การเจริญคงที่และ 6. การเจริญเสื่อม โดยทั่วไปพบว่าจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านระยะปรับตัวไปแล้ว และเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมอัตราการเจริญสูงสุดที่ได้ในระยะการเจริญเอกซ์โพเนนเชียลจะเริ่มลดลง โดยที่ปริมาณของจุลินทรีย์จะมากที่สุดเมื่อถึงระยะ

การเจริญคงที่และจะลดลงในระยะการเจริญเสื่อม เนื่องจากการตายเกิดขึ้น การเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น กล้าเชื้อที่มีชีวิตอยู่ (viable inoculum) แหล่งพลังงาน สารอาหาร สารยับยั้งการเจริญ และ ภาวะทางเคมีกายภาพ เมื่อปัจจัยดังกล่าวอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมโดยปราศจากสารยับยั้งการเจริญ พบว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์เป็นไปตามสมการต่อไปนี้

$$dCx/dt = \mu Cx$$

เมื่อ Cx = ปริมาณของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราจำเพาะของการเจริญ (ต่อชั่วโมง)

2. การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture) (สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ ไทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ, 2538)

การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะในสภาพที่มีภาวะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารอาหารความเข้มข้นสูง การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวนิยมใช้มากที่สุดสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ และการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดทุติยภูมิเพราะสามารถให้อัตรามลผลิตเซลล์และผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบชุด โดยควบคุมอัตราการเติมสารอาหารที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงอยู่ในภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ หรือการเกิดผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา ระบบนี้มีข้อดีสามารถควบคุมปริมาณสารอาหารที่เหลือให้มีความเข้มข้นเหมาะสม ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญและใช้ออกซิเจนปริมาณไม่มากเกินไป ความสามารถในการให้อาหารของถังหมักช่วยลด repressive effect ของแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ได้อย่างรวดเร็วลดความเป็นพิษของส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อและลดการสร้างสารอินทรีย์ที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียเนื่องจาก crab-tree effect

เทคนิคการควบคุมการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยทั่วไปแบ่งได้ 2 วิธี ดังนี้

การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) เป็นการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารด้วยระบบอัตโนมัติ ซึ่งอาจจะเป็นการควบคุมด้วยการวัดความเข้มข้นของสารอาหารโดยตรงหรือเป็นการควบคุมทางอ้อมโดยอาศัยพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ และการใช้สารอาหาร อาทิเช่น DO, RQ, pH, pCO_2 เป็นต้น

การควบคุมแบบธรรมดา (without feedback control) ซึ่งอาจจะเป็นการเติมสารอาหารเป็นระยะ (intermittent addition) หรือเป็นการควบคุมการเติมสารอาหารด้วยอัตราคงที่ (constant rate) หรือด้วยอัตราแบบเอกซ์โพเนนเชียล เป็นต้น (Curless et al., 1991)

อัตราการไหลสารอาหารเริ่มต้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์คำนวณได้จาก

$$F_0 = \mu V_0 X_0 / S_{F_0} Y_{x/s}$$

F_0 = อัตราการไหลเริ่มต้น (ลิตรต่อชั่วโมง)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) (ต่อชั่วโมง)

V_0 = ปริมาตรอาหารเริ่มต้น (ลิตร)

X_0 = ผลผลิตของมวลรวม (biomass yield) (กรัมต่อลิตร)

S_{F_0} = ความเข้มข้นของสับสเตรต (กรัมต่อลิตร)

$Y_{x/s}$ = ผลผลิตจำเพาะของแบคทีเรีย (specific yield)

อัตราการไหลของอาหารระหว่างการเลี้ยงเซลล์

$$F = F_0 \exp(\mu t)$$

F = อัตราการไหลอาหารระหว่างการเลี้ยงเซลล์ (ลิตรต่อชั่วโมง)

t = เวลาในการไหลอาหาร (ชั่วโมง)

3. การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) (สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ ไทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ, 2538)

ระยะการเจริญแบบเอกซโพเนนเชียลของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบชุดสามารถดำเนินต่อไปได้อีก ถ้าหากมีการเติมอาหารเหลวใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติมอาหารเหลวใหม่ที่เหมาะสมสถานะคงตัว (steady state) จะสามารถเกิดขึ้นได้ เมื่อปริมาณของเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่สมดุลกับปริมาณของเซลล์ที่ไหลออกจากถังหมัก จึงเรียกเทคนิคการหมักแบบนี้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

เมื่อกำหนดให้อัตราการเจือจาง (dilution rate) หมายถึงอัตราการเติมอาหารเหลวใหม่หารด้วยปริมาตรของอาหาร ดังแสดงในสมการ

$$D = F/V$$

เมื่อ F = อัตราการเติมอาหารเหลวใหม่ (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของอาหาร (ลิตร)

D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

โดยการที่อัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อเวลาขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ และปริมาณของเซลล์ที่หายไปเนื่องจากไหลออกไปกับน้ำหมัก

ปฏิกรณ์การสลายเซลล์แบบถังกวน (lysis reactor)

ปฏิกรณ์แบบถังกวนนี้ใช้สำหรับทำการสลายเซลล์ด้วยต่าง และการทำให้ lysate เป็นกลางเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยถังทรงกระบอกทำด้วยโลหะพอกสแตนเลส มีทั้งชนิดที่ตัวกวน (agitator) ขับเคลื่อนด้านบน (top-driven) หรือขับเคลื่อนด้านล่าง (bottom-driven) โดยชนิดขับเคลื่อนด้านบนมักนิยมใช้ เพราะสะดวกในการใช้งาน ถังกวนขนาดเล็กชนิด bench-top มักเป็นแก้วชนิด borosilicate glass ฝาปิดด้านบนทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมมีที่ยึดกับตัวถัง ตัวมอเตอร์ยึดอยู่กับแกนด้านบน ตัวถังพร้อมอาหารเลี้ยงเชื้อและโพรบ (probes) สามารถนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันได้ แต่ถังกวนบางชนิดก็มีระบบฆ่าเชื้อในตัว ตัวถังชนิดเป็นแก้วมีหลายขนาดตั้งแต่ 1-30 ลิตร

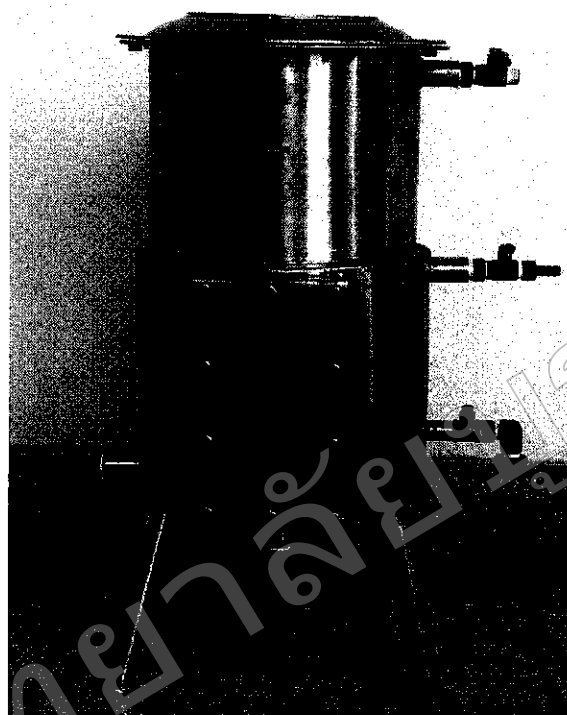


ภาพที่ 2-1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (<http://BBERG.buu.ac.th>)



ภาพที่ 2-2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 ลิตร
(<http://BBERG.buu.ac.th>)

ถังหมักขนาดเล็กชนิดตัวถังเป็นเหล็กกล้าไร้สนิมที่ขนาดตั้งแต่ 1-100 ลิตร มักเป็นแบบที่สามารถฆ่าเชื้อในตัวได้ ปกติถังหมักประเภทนี้สามารถป้องกันการเจริญเจริญของจุลินทรีย์ด้านข้างตัวถังได้ ส่วนระบบควบคุมอุณหภูมิจะให้น้ำเย็นหล่อโดยรอบของตัวถังเป็นแจ็กเก็ต (jacket) อีกชั้นหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีชุดอุปกรณ์ควบคุม ความเป็นกรดต่าง การกวน การให้อากาศ การเกิดฟอง และเครื่องวิเคราะห์ก๊าซที่ออก (exhaust gas analyzer) ประกอบอยู่ด้วยตามแต่ความต้องการของผู้ใช้ (Scrugg, 1991)



ภาพที่ 2-3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนสำหรับการสลายเซลล์ขนาด 10 ลิตร
(<http://BBERG.buu.ac.th>)

การสลายเซลล์ (cell lysis)

1. การแยกพลาสมิดโดยการสลายเซลล์ด้วยด่าง (alkaline – cell lysis)

การสลายเซลล์ด้วยด่าง

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิดให้ได้เซลล์ปริมาณมาก ในกรณีที่แบคทีเรียมีพลาสมิดจำพวก relaxed พลาสมิดจะทำการเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดต่อหนึ่งเซลล์ให้มากขึ้นโดยการเติมคลอแรมฟินิคอลลงในอาหารที่มีเชื้อกำลังเจริญอยู่ในระยะ log phase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปล่อยให้เจริญต่อประมาณ 6-16 ชั่วโมง ก่อนเก็บเซลล์ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยด่าง โดยธรรมชาติต่างเป็นสาเหตุให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนและโครโมโซมอลดีเอ็นเอแต่ไม่มีผลต่อพลาสมิดดีเอ็นเอ (Birboim & Doly, 1979) การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่างทำได้โดยการสลายเซลล์เพื่อให้เซลล์แตกโดยการใส่ detergent พวกสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate, SDS) ผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยมี RNase A อยู่ด้วย SDS จะสลายฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลายส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์จะ

ทำให้โครโมโซมอลดีเอ็นเอเสียสภาพแต่ไม่มีผลต่อพลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็น supercoil พลาสมิดจะแยกออกจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอ โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอทั้งสอง โครโมโซมอลดีเอ็นเอจะมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดดีเอ็นเอมาก ดังนั้นขณะที่หลุดออกจากเซลล์ที่แตกจึงมักถูกตัดด้วยแรงเฉือนได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเปิด ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดเล็กกว่ามากนั้นจะไม่ถูกตัดจึงยังคงอยู่ในรูปวงแหวน และเมื่อปรับ pH ให้เป็นกลางพลาสมิดสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ (re-naturation) พลาสมิดมีขนาดเล็กและมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ส่วนดีเอ็นเอของโครโมโซมมีขนาดใหญ่และอยู่ในรูปปลายเปิดเมื่อปรับ pH ให้เป็นกลางรวดเร็ว แต่จะสายของดีเอ็นเอจะพันกันคล้ายตาข่ายและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ จึงทำให้รวมตัวกันเป็นเศษเซลล์และเกิดการตกตะกอน (Qiagen, 1997)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสลายเซลล์แบคทีเรียด้วยต่าง

ค่า pH ที่ใช้ในการสลายเซลล์แบคทีเรียอยู่ในช่วง 11.5-12.5 เป็นช่วงที่สามารถสลายเซลล์ได้ดี pH ที่มากกว่า 12.5 ทำให้โครโมโซมอลดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองเสียสภาพไป หรือสามารถเกิดการเสียสภาพอย่างถาวรใน แต่ถ้า pH ต่ำกว่า 12 การสลายเซลล์จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อย (Birboim & Doly, 1979)

อุณหภูมิ ที่ใช้ในอัตราการสลายเซลล์ที่ดีจะอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส (Chamsart, 2001)

เวลา ที่ใช้ในการสลายเซลล์ได้ดีอยู่ในช่วง 5 นาที (Chamsart, 2001)

2. เทคนิคการทำให้เซลล์แตก

2.1 โดยวิธีกล (Limon-Lason et al., 1997) และ (Ageskvist & Enfors, 1990)

ใช้ลูกปัดบด (bead milling) และ (Sauer, Robinson & Glick, 1988) ใช้เครื่องบดเซลล์ความดันสูง (high-pressure homogenizer) ทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกสารพวกโปรตีนออกจากเซลล์ แต่วิธีเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาเมื่อเทียบกับวิธีการทำให้เซลล์แตกโดยใช้ต่างแก่ คือ ทำให้ lysate มีความหนืดมากซึ่งจะเป็นผลให้กระบวนการแยกพลาสมิดหรือสารอื่นทำได้ยาก เช่น การกรองทำได้ยากมาก นอกจากนั้นยังมีผลทำให้โครโมโซมอลดีเอ็นเอแตกหักมากและจะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์พลาสมิดดีเอ็นเอได้ ส่วน Carlson, Signs, Liermann, Boor & JimJem, 1995) สกัดพลาสมิดโดยใช้เทคนิคการทำให้เซลล์แตกโดยทางกล ได้แก่ sonication, nebulisation, homogenisation, microfluidisation และ bead milling (ยกเว้น microfluidisation) วิธีที่เหลืออื่นๆ เหล่านี้ให้ผลไม่ดีคือทำให้ได้ผลผลิตพลาสมิดเพียง 20 % เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการทำให้เซลล์แตกทางกลนี้ไม่เหมาะที่จะใช้สกัดพลาสมิดในระดับอุตสาหกรรม

2.2 โดยการใช้ต่างแagger่วมกับสาร detergent สลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยการทำให้เซลล์แตกใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับ SDS โดย SDS เข้าทำลายพันธะไฮโดรเจนขององค์ประกอบผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตกซึ่งองค์ประกอบต่าง ๆ จะถูกปลดปล่อยออกมาได้แก่ โครโมโซมอลดีเอ็นเอและโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกปล่อยออกมาและโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้โครโมโซมอลดีเอ็นเอและโปรตีนเสียสภาพ เมื่อปรับ pH ให้เป็นกลาง เช่น โดยการเติมโพแทสเซียมอะซิเตท (potassium acetate) (pH 5.5) จะเกิดการตกตะกอนของดีเอ็นเอ เศษเซลล์ อาร์เอ็นเอและอื่นๆ แต่พลาสมิดดีเอ็นเอจะแขวนลอยในสารละลาย การที่พลาสมิดสามารถคืนสู่สภาพเดิมได้เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดเล็ก ส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอเสียสภาพอย่างถาวร และรวมตัวเป็นกลุ่มตกตะกอนลงมาทำให้สามารถแยกพลาสมิดจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอได้

อย่างไรก็ตามปัญหาการทำลายพลาสมิดดีเอ็นเอและโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยวิธีกลและเคมียังคงขึ้นอยู่กับความหลากหลายในกระบวนการผลิต การออกแบบ การทำงานในปฏิกิริยาการสลายเซลล์ และขั้นตอนการกรอง (Chamsart, 2001)

3. การทำให้เป็นกลางเพื่อตกตะกอนโปรตีน และเศษเซลล์

การตกตะกอนโปรตีนและเศษเซลล์ โดยการปรับค่า pH ให้อยู่ในระดับกลางหรืออาจใช้สารเคมีที่เป็นด่าง เช่น การใช้โพแทสเซียมอะซิเตท หรือโซเดียมอะซิเตท มาปรับค่า pH ให้เป็นกรดเพื่อให้ได้สารละลายเกลื่อ และเมื่อผสมกับสารละลาย lysate แล้วจะได้ค่าเป็นกลาง

การตกตะกอนโปรตีนจะทำหลังจากการทำลายเซลล์แล้วโดยการใช้สารละลายเกลื่อที่มีความเข้มข้นสูงนั้นจะทำให้พลาสมิดคืนรูปร่าง ส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ โปรตีนผนังเซลล์ และสาร SDS จะรวมตัวกันเป็นตะกอนในรูปของเศษเซลล์ การตกตะกอนโปรตีนนี้ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ง่ายต่อการแยกพลาสมิดโดยการใช้การกรอง

ตะกอนของโปรตีนหรือเศษเซลล์นั้นได้มาจากการรวมตัวของอนุภาคเล็ก ๆ ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น การกวนของเหลวจะมีผลทำให้เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคเล็ก ๆ จนกระทั่งขนาดของเศษเซลล์เพิ่มขึ้น โครงสร้างของเศษเซลล์นั้นจะก่อเกิดรูปร่างโดยการเหนี่ยวนำของแรงหมุนใบพัดที่ช่วยคืนโครงสร้างของเศษตะกอนให้จับกลุ่มกัน ปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอนมีหลายปัจจัย เช่น อัตราเร็วของใบพัด ประเภทของใบพัด เวลาในการกวน ลักษณะทางกายภาพ และโครงสร้างของสารตะกอน (George, 2000)

สรุปโดยรวมหลักการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์

เริ่มจากการหมักเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง จากนั้นทำการสลายผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายต่างแก่ (pH ~ 12.5) ภายในท่อแก้วที่มี static mixer ในขณะเดียวกันต่างจะทำหน้าที่ให้โครโมโซมอดีเอ็นเอเสียสภาพโดยการตัด phosphodiester bonds ทำให้โครโมโซมอดีเอ็นเอมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และยังเป็นการสลาย (degradation) โครโมโซมอดีเอ็นเอบางส่วนให้ตกตะกอนทิ้งไป แต่ต่างจะไม่ทำลายพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากพลาสมิดจะมีขนาดโมเลกุลที่เล็กและขดเป็น supercoil อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้ pH ที่สูงและเวลาที่นานเกินไปเช่น ไม่ควรเกิน 10 นาที เพราะอาจจะทำให้พลาสมิดเสียสภาพได้ ต่อไปจะเป็นขั้นตอนของการตกตะกอนโปรตีน เคาะเซลล์ และโครโมโซมอดีเอ็นเอด้วยสารละลายเกลือ (organic salt solution) ที่ความเข้มข้นสูงและมี pH เป็นกรด เช่น 3 M โฟแทสเซียมอะซิเตต pH 5.5 ซึ่งความเป็นเกลือที่สูงนี้จะช่วยป้องกันพลาสมิดจากการเสียสภาพและยังช่วยให้พลาสมิดที่เสียสภาพไปแล้วกลับคืนสู่สภาพเดิม (re-nature) ได้อีกด้วย โดยที่พลาสมิดจะแขวนลอยอยู่ในสารละลายที่ใส ขั้นตอนต่อไปเราก็นำพลาสมิดไปปั่นเหวี่ยง หรือกรองเพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่สีขาวที่เรียกว่าเคาะเซลล์ออก จากนั้นเป็นการทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์โดยการใช้วิธีการ anion-exchange chromatography และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดที่ได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

static mixers

คณะผู้วิจัยของ BBERG มีแนวความคิดใหม่ที่จะสลายเซลล์ โดยการใช้ In – Line Mixer (static mixer) ซึ่งเป็นเครื่องมือราคาประหยัดกว่าถังกวน ความลับซับซ้อนน้อยกว่าและสามารถใช้เวลาการสลายเซลล์เพียงไม่กี่วินาที และที่สำคัญสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง (Chamsart, 2001) ในกระบวนการผลิตทั้งหลายนั้นบางส่วนของกระบวนการอาจจำเป็นต้องใช้กระบวนการผสมสารต่าง ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกันในระยะเวลาอันสั้น เพราะสารสองตัวอาจมีการแยกชั้นกันเนื่องจากความหนาแน่นที่ต่างกัน ในกรณีนี้จึงเป็นการยากที่จะทำให้มีการกระจายอย่างทั่วถึงด้วยวิธีการใช้เครื่องกวนแบบธรรมดา จึงได้มีการใช้อุปกรณ์ในการผสมที่มีโครงสร้างพิเศษขึ้นมาที่เรียกว่า static mixers

static mixers เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับกระบวนการผสมสาร ประกอบด้วยท่อท่อนที่มีได้ (element) เป็นอุปกรณ์ที่ไม่มีการเคลื่อนไหวสอดอยู่เมื่อมีการไหลของเหลวผ่านเข้าไปในท่อของเหลวจะผสมกัน โดยได้ที่สอดอยู่ในท่อจะเป็นตัวช่วยผสมสารให้เข้ากันโดยทั่วไปตัวได้ท่อของ static mixer ถูกออกแบบโครงสร้างที่มีรูปทรงเรขาคณิตเป็นพิเศษสำหรับทำหน้าที่ให้ของเหลว

ภายในท่อผสมกันได้ดี พลังงานที่ใช้ใน static mixer ได้จากการบีบของเหลวจากภายนอกเข้าไปในท่อเพียงอย่างเดียวพลังงานจะดันสารเข้าไปผสมกันภายในท่อ อย่างไรก็ตามเพื่อให้สารเกิดการผสมกันภายในท่อได้อย่างสมบูรณ์จึงมีการพัฒนาไส้ที่สอดใส่เข้าไปภายในท่อ โดยจะมีลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการดันผ่านเข้าไปให้มีการผสมกันได้ในเวลารวดเร็ว นอกจากนี้ไส้ท่อที่มีรูปร่างที่เหมาะสมกับสารแล้วความยาวท่อ ยังมีส่วนในการผสมสารให้เข้ากันได้มากยิ่งขึ้นด้วย เช่น สารที่มีความหนืดสูงเมื่อผ่านการผสมผ่านท่อแล้วความหนืดจะลดลง พบว่าการลดลงของความหนืดจะสัมพันธ์กับความยาวท่อซึ่งภายในมีไส้อยู่ (Godfrey, 1992)



ก



ข



ค

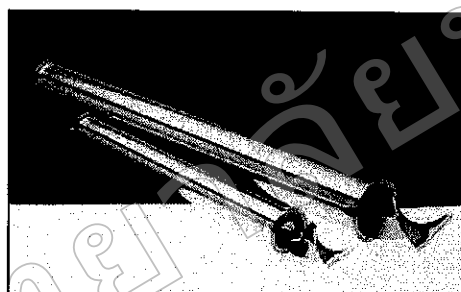
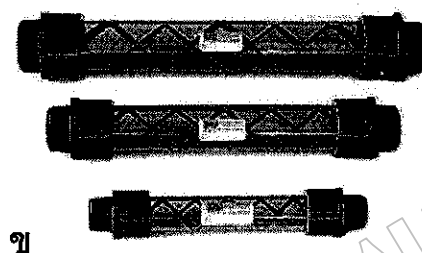
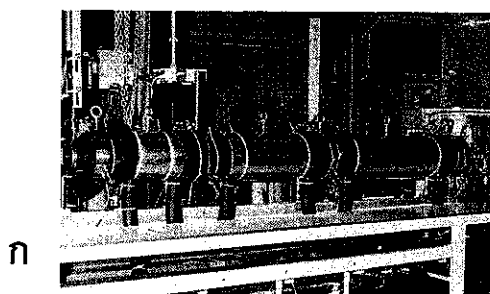
ภาพที่ 2-4 รูปแบบต่าง ๆ ได้ (element) ของ static elements

(www.chemineer.com/kenics-km.php)

ก. AD static mixer

ข. KMR static mixer ชนิด stainless steel static mixer cleaning

ค. KMX static mixer ชนิด TAH series 50



ภาพที่ 2-5 static elements ที่ถูกใส่ไว้ภายในท่อ

(www.ingentaselect.com/titles/02638762.htm)

- ก. KMX static mixer ชนิด SM2-reactor
- ข. Sch 80 grey PVC
- ค. KMX static mixer ชนิด helical static mixer

1. ประโยชน์ของ static mixers

static mixers มีความแตกต่างกันโดยสร้างตามรูปแบบการไหล และการใช้ประโยชน์ ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการทางอุตสาหกรรมเคมี การนำมาประยุกต์ใช้ในระบบการต่าง ๆ เช่น การผสม โพลีเมอร์ไลเซชัน (polymerization) และ การถ่ายเทความร้อน (heat transfer) รวมถึงการประยุกต์ของโพลีเมอร์ (polymers) ซึ่งหลักการของกระบวนการ คือ การทำให้สารไหลอย่างช้าๆ โดยใช้เครื่องกวนสารหรือเครื่องนวด ในอดีตเครื่องกวนสารถูกแทนที่ด้วย static mixers

2. ข้อดีของการใช้ static mixers

- 2.1 เป็นส่วนที่ไม่เคลื่อนที่จึงทำให้ไม่เกิดความสึกกร่อนและเสียหายต่ำ
- 2.2 ใช้แรงดันในการทำงานน้อยทำให้อุปกรณ์และสารไม่ให้อุปกรณ์แรงดันมาก ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการเสียหาย

2.3 ใช้พลังงานในการทำงานน้อยกว่าการใช้กังวหลายเท่า เพราะใช้เพียงปั๊มเพื่อไหลสารให้ผ่านท่อที่มีได้ statics สอดอยู่เท่านั้น

2.4 ควบคุมคุณภาพของการผสมได้ดี

2.5 สามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องและ ลักษณะการไหลมีการไหลเป็นช่วง ๆ อย่างเป็นรูปแบบ

2.6 ใช้เวลาทำความสะอาดน้อย

2.7 ใช้พื้นที่น้อยเพราะมีขนาดเล็ก

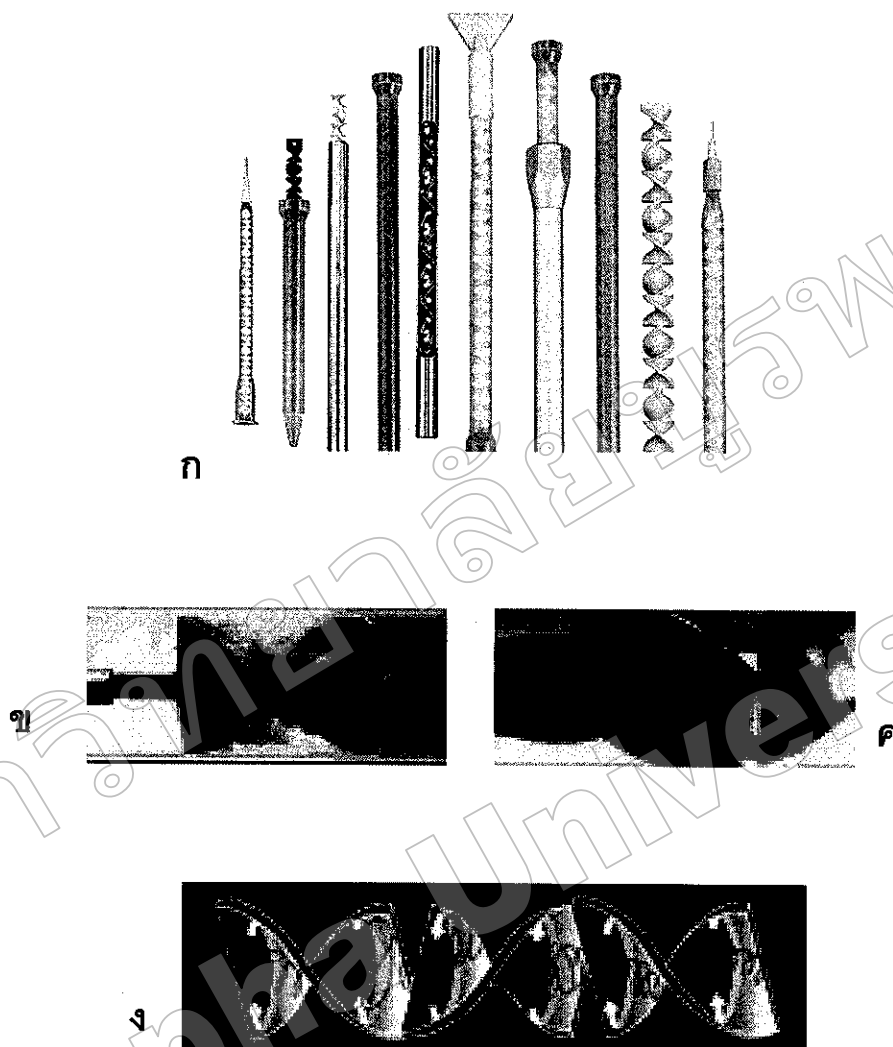
2.8 ไม่ต้องใช้ซีล (seals) เหมือนกับการใช้กังว

2.9 ราคาถูกกว่าการใช้กังว การลงทุนต่ำ ผลกำไรสูง

3. การใช้ static mixers สำหรับงานด้านต่าง ๆ

3.1 การผสมสาร (mixing)

ได้มีการใช้ static mixers ในการผสมสารสองชนิดหรือมากกว่าโดยใช้ท่อที่มี static element ไว้และมีช่องสำหรับปั๊มสารแต่ละชนิดให้ไหลเข้าไปรวมกันอย่างทั่วถึงในท่อ เช่น สารชนิดที่ 1 ถูกปั๊มเข้าทางด้านบนเมื่อต้องการผสมกับสารชนิดที่ 2 จึงปั๊มเข้าอีกด้านของท่อ จากนั้นสารสองชนิดจะไหลมาผสมกันตามรูปแบบของ static mixers โดยไม่กำหนดจำนวนชนิดของสาร



ภาพที่ 2-6 การไหลของสารตามแบบของการใช้ static element ชนิด Kenic

(www.chemineer.com/kenics-km.php)

- ก. Kenic static mixers แบบต่าง ๆ
- ข. Turbulent Blending KM Static Mixer
- ค. Laminar Blending KM Static Mixer
- ง. ทิศทางการไหลของสารผสมใน static element

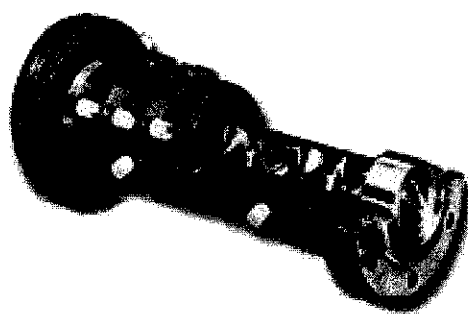
3.2 การทำให้เป็นโพลิเมอร์ (polymerization)

มีการนำ static mixers มาใช้ประโยชน์ในการผลิตโพลิเมอร์ จากกระบวนการ polymerization ซึ่งกระบวนการนี้มีหลากหลายในปัจจุบัน เช่น ในการผลิตไนลอน (nylon),

ซิลิโคน (silicone), สไตรีน (styrene), โพลีโพรไพลีน (polypropylene), โพลีเมอร์ (polymer) อื่น ๆ และ พลาสติก (plastics) ตัวอย่างกระบวนการ polymerization ที่ใช้ผลิตโพลีสไตรีน (polystyrene) เริ่มมีการนำ static mixers มาใช้ในกระบวนการนี้มานานแล้ว เริ่มต้นจะใช้ โมโนเมอร์ (monomer) ของนาโพลีสไตรีนไปกวนในถังกวนแบบโดยใช้ใบพัดแบบ turbine ในกระบวนการนี้มีความหนืดและความร้อนเกิดขึ้นต่ำที่สุด ความหนืดน้อยใบพัดจึงสามารถทำงานได้อย่างปกติ จากนั้นสารจะถูกนำไปกวนอีกครั้งในถังกวนที่ใช้ใบพัด helical ribbon ความหนืดในช่วงนี้จะสูงขึ้นและใช้เวลากวนประมาณ 1-2 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อไปสารจะถูกส่งไปที่ jacket static mixers ความหนืดที่เกิดขึ้นจะเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมเมื่อเทียบกับการกวนในถังที่สอง ซึ่งต้องใช้แรงในการหมุนและพลังงานมากกว่า jacket static mixers ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการต่อโมเลกุลของโมโนเมอร์ของโพลีสไตรีนให้ยาวขึ้นเรื่อย ๆ ที่ static mixers ตัวสุดท้าย นอกจากในการสร้างโพลีเมอร์แล้ว static mixers ยังถูกนำมาใช้ในการสลายน้ำมันภายในท่ออีกด้วย เช่น น้ำมันดอกทานตะวัน (Chen, 1975)

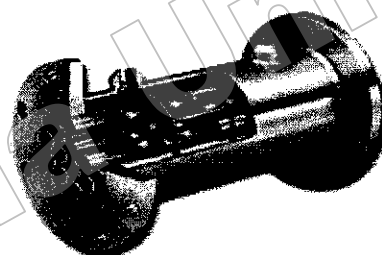
3.3 การส่งถ่ายความร้อน (heat transfer)

ได้มีการนำ static mixer มาดัดแปลงใช้ในกระบวนการถ่ายเทความร้อน นอกเหนือจากการใช้เพื่อการกวนผสมและผลิตโพลีเมอร์จากที่ได้กล่าวไว้ว่าการผสมสารในท่อที่ใช้ static element ไว้ภายในจะทำให้สารผสมกันอย่างทั่วถึง แต่ในบางปฏิกิริยามีความร้อนหรือความเย็นเกิดขึ้นและต้องการให้สารภายในท่อเกิดการเย็นตัวลงหรือร้อนขึ้น จึงใช้ท่อหุ้มไว้ภายนอกอีกชั้นหนึ่ง (ภาพที่ 2-7 และ 2-8) เพื่อปั๊มของร้อนหรือของเย็นเข้าสู่ภายในท่อชั้นนอกเพื่อการแลกเปลี่ยนความร้อน ความเย็น ดังนั้นสารที่ไหลออกมาจึงมีอุณหภูมิตามที่กำหนดไว้ static mixers ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงความร้อนแบบ monotube (monotube static mixer heat exchangers) จะใช้ได้ดีสำหรับอัตราการไหล 1.32 มิลลิลิตรต่อวินาที ขนาดท่อเล็กกว่าและเหมาะสำหรับการละลายโพลีเมอร์ และสารที่ละลายที่สลายตัวได้ง่าย ข้อระวังในการใช้คือเวลาที่สารอยู่ในอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์เสียคุณภาพ (ภาพที่ 2.7) (Thakur et al., 2003)



ภาพที่ 2-7 ลักษณะของ static mixer แบบ monotube heat exchanger
(www.chemineer.com/kenics-heat-exchangers.php)

static mixers ที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนความร้อนแบบหลายท่อ (multitube static mixer heat exchangers) เหมาะสำหรับการสลายโฟลไมเออร์กับน้ำมันที่มีอุณหภูมิสูงมากดังนั้นจึงต้องใช้ช่วงเวลาให้เหมาะสมอัตราในการถ่ายเทความร้อนสูงต้องระมัดระวังในการใช้เมื่อเกิดความหนืดขึ้นภายในท่อ เพราะจะเกิดการไหลแบบไม่เหมาะสมระหว่างหลอดที่ใกล้เคียงกันทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาไม่ดี (ภาพที่ 2-8)



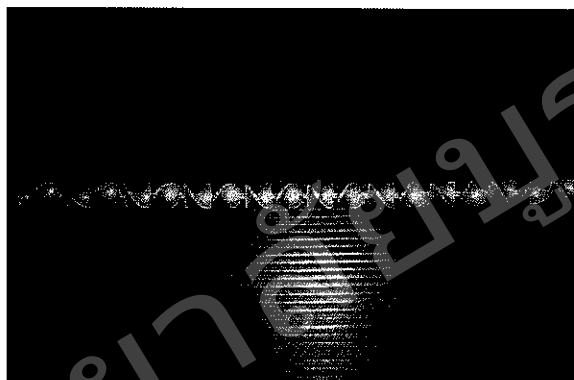
ภาพที่ 2-8 ลักษณะของ static mixer แบบ multitube heat exchanger
(www.chemineer.com/kenics-heat-exchangers.php)

5. การประยุกต์ใช้สำหรับงานกระบวนการชีวภาพ (bioprocess)

ปัจจุบันมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ static mixer สำหรับงานทางด้านชีววิทยา กระบวนการน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย ส่วนใหญ่จะเป็นการประยุกต์ใช้เพื่องานทางด้านวิศวกรรมเคมี เพื่อการผสมสารหรือใช้ทำปฏิกิริยาหรือเป็นอุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อน

6. static mixer ที่ใช้ในการศึกษา

static mixer ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นชนิด Kenic มีจำนวน 24 elements มีความยาวของ mixer เท่ากับ 9-3/8 นิ้ว และมีเส้นผ่านศูนย์กลางยาว 3/8 นิ้ว ซึ่งมีลักษณะดังภาพ (ภาพที่ 2-9)



ภาพที่ 2-9 ลักษณะของได้ static element ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

static mixer ชนิดนี้เรียกว่า In-Line Static Mixer ซึ่งได้ element สอดไว้ในท่อแก้ว เพื่อให้การผสมสารเข้ากันได้ดังภาพ (ภาพที่ 2-10)



ภาพที่ 2-10 ลักษณะของ static element ที่ใส่ไว้ในท่อแก้ว

In-Line Static Mixer มีประสิทธิภาพดี บางชนิดที่มีการออกแบบที่ดีสามารถในการช่วยผสมสารและสามารถต้านทานการเปลี่ยนแปลงของความดันได้มากถึง 1,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้วซึ่งในการศึกษาทดลองครั้งนี้จะทำการสลายเซลล์ด้วยวิธีการใช้สาร 2 ชนิดไหลเข้าไปในท่อที่มีได้ element อยู่ ดังรูปที่ได้กล่าวมาแล้วให้เข้าไปเจอกันทำให้มีการกวนผสม

ของสารได้มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าที่ไม่มีได้ element ทำให้สารทั้ง 2 ชนิดผสมเข้ากันได้ดีและยังเป็นการลดระยะเวลา ต้นทุน และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูงอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับ การทำในถังหมักซึ่งรายละเอียดต่าง ๆ จะกล่าวไว้ในบททดลองต่อไป

รีโอโลยี (rheology)

รีโอโลยี หมายถึง ศาสตร์การเสียรูปทรงและการไหลของสาร “ the science of the deformation and flow of matter” ถ้ามีการผลักแรง F อย่างต่อเนื่องบนผิวของลูกบาศก์หรือ (ตั้งของกระดาษ) สมมติว่าวัสดุชิ้นนั้นเป็นของแข็งในอุดมคติวัตถุชิ้นนั้นจะเปลี่ยนรูปทรง (ดังภาพที่ 2-12) การเสียรูปทรงนี้เรียกว่า การเสียรูปทรงเนื่องจากแรงเฉือน (shear deformation) การเสียรูปทรง (X) และ ความสูง (h) สามารถใช้อธิบายแรงเฉือนคั่น (shear strain) หรือ γ โดย

$$\gamma = X/h = \tan \quad (1)$$

และแรงเครียดเฉือน (shear stress, σ) สามารถคำนวณได้จาก

$$\sigma = F/A \quad (2)$$

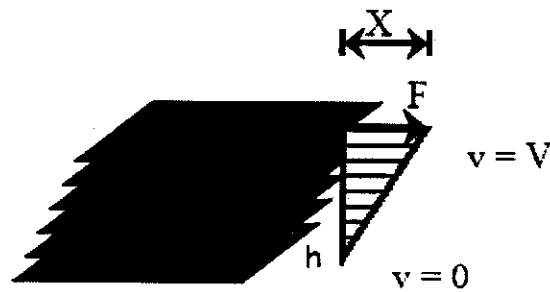
A คือ พื้นที่ผิวด้านบนของบาศก์ หน่วยของ σ คือ นิวตันต่อตารางเมตร (N/m^2) หรือ ปาสคาล (Pa)

ส่วนอัตราการเปลี่ยนแปลงของแรงคั่นเฉือนนั้น อธิบายได้ในรูปของอัตราแรงคั่นเฉือน (shear rate, $\dot{\gamma}$) โดย

$$\dot{\gamma} = d\gamma/dt \quad (3)$$

สำหรับของเหลวในอุดมคติ (newtonian fluid) อัตราเฉือนเนื่องจากการให้แรงเครียดจะสัมพันธ์โดยตรงกับความหนืด (viscosity, μ) ซึ่งหมายถึงความต้านทานการไหลของสาร (material's resistance to flow) โดยที่ความหนืด

$$\mu = \sigma/\dot{\gamma} \quad (4)$$



ภาพที่ 2-11 ลักษณะแรงที่กระทำต่อพื้นที่ในลักษณะด้านการไหลของสาร

(<http://www.mtec.or.th/th/labs/rheology/images/pdf/rheo-4-04-46.pdf>)

โดยที่ F คือ แรงกลที่กระทำต่อของไหลพื้นที่หน้าตัด (A)

ทำให้เกิด gradient ของความเร็วในการไหล (V) ตามระยะห่าง (h)

การทดสอบค่าความหนืดส่วนใหญ่จะเป็นการไหลแบบเฉือนอย่างง่าย

(simple shear flow) การไหลดังกล่าวสามารถมองได้เหมือนการเลื่อนตัวของแผ่นกระดาษในกองกระดาษดังแสดงในภาพข้างต้น โดยที่กระดาษแต่ละแผ่นเป็นเหมือนชั้นของเหลวบาง ๆ ที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่ากัน (ดังภาพที่ 2-11)

1. กลไกของความหนืด (สถาพร บุญสมบัติ และ วิจิต บัวแก้ว, 2530)

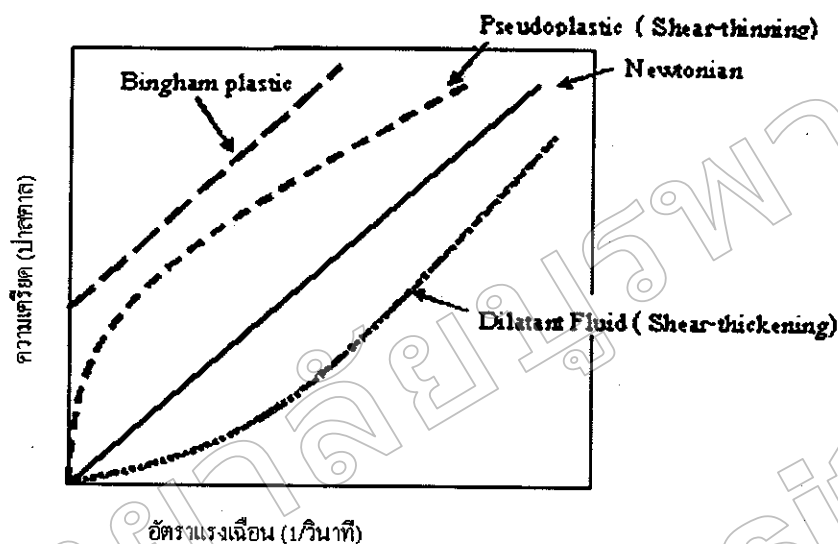
ความหนืดของของไหลเป็นผลจากเหตุ 2 ประการหลัก คือ การรวมตัวกัน และการเปลี่ยนกำลังเคลื่อนไหวของวัตถุการรวมตัวกันเป็นสาเหตุเบื้องต้นของความหนืดในของเหลว การรวมตัวกัน คือ แนวโน้มที่โมเลกุลจะเข้าไปอยู่ใกล้กันและกัน และต่อต้านการถูกทำให้เปลี่ยนรูปร่าง ขณะที่ของไหลได้รับความร้อนเข้าไปการเคลื่อนที่ของโมเลกุลก็เพิ่มขึ้นและการรวมตัวกันก็ลดลง ดังนั้นความหนืดอันเนื่องมาจากการรวมตัวกันก็จะลดลง เพราะอุณหภูมิเพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนกำลังการเคลื่อนไหวส่งผลเมื่อโมเลกุลที่เคลื่อนที่เร็วกว่าเปลี่ยนไปอยู่ในที่โมเลกุลที่เคลื่อนที่ช้ากว่าอยู่หรือสลับกัน การเปลี่ยนกำลังการเคลื่อนไหวนี้นำให้เกิดแรงตามสมการแบบนิวตัน ซึ่งทำให้เกิดความหนืดสำหรับก๊าซโมเลกุลมีการรวมตัวกันน้อย แต่เคลื่อนที่ได้อิสระกว่าของเหลว ดังนั้นการเปลี่ยนกำลังเคลื่อนไหวเป็นสาเหตุแรกของความหนืดของในก๊าซ ถ้าก๊าซถูกทำให้ร้อนจะมีลำดับความเร็วที่สูงขึ้นระหว่างโมเลกุลที่เคลื่อนที่เร็วกับโมเลกุลที่เคลื่อนที่ช้า ดังนั้น ความหนืดจึงเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

2. การไหลแบบลามินาร์และเทอร์บูเลนต์ (laminar and turbulent flow)

รูปแบบสายกระแสที่ภาพที่ 2-11 แสดงภาพการไหลแบบ laminar (หรือที่เรียกว่า stream flow หรือ viscous flow) ความจริงแล้วชั้นต่าง ๆ ของการไหล ไหลมาซ้อนกันต่อ ๆ มา เหมือนกับลำรับไฟตอนเราเดินไฟที่เหลือไประหว่างไฟบนกับไฟล่าง ชั้นต่าง ๆ ของการไหลจะไม่รวมหรือปะปนกันและคงตำแหน่งที่สัมพันธ์กันดั้งเดิม อย่างไรก็ตามในหลายคราวที่ความพยายามจะจับสายกระแสโดยใช้ควันทหรือย้อมสีกระแสของไหลนั้นล้มเหลว และแทนที่จะได้รูปแบบผลกลับไม่ชัดเจนมีแต่ควันทหรือสีที่ย้อมควันท หรือสีที่ย้อมผสมและกระจายไปทั่วกระแสไหล แสดงถึงว่าของไหลเคลื่อนที่เป็นชั้น ๆ แต่เคลื่อนที่ไปรอบ ๆ บางทีก็เป็นชั้น ๆ บางทีก็ไม่ใช่เนื้อของไหลไม่คงอยู่ในตำแหน่งที่สัมพันธ์กันดั้งเดิมแต่เปลี่ยนไปเรื่อย ๆ การไหลแบบนี้เรียกว่า การไหลแบบ turbulent (สถาพร บุญสมบัติ และ วิจิต บัวแก้ว, 2530)

การไหลแบบปั่นป่วน (turbulent) อาจเกิดตามธรรมชาติได้ เพราะกระแสของไหลเอง หรือมีฉะนั้น turbulence ก็อาจจะเกิดจากการสั่นสะเทือน การคน หรือการบีบของไหล และวิธีการไหลทั้งสองแบบอาจเกิดขึ้นในสภาพการไหลที่ออกมาได้ การไหลปกติก็อาจเป็นแบบเฉื่อย (laminar) ก่อนและเปลี่ยนเป็น turbulent ณ จุดใดจุดหนึ่งตอนล่างของสายกระแสหรือมีฉะนั้น turbulence ที่เกิดขึ้นจะไปชะลอกระแสตอนล่าง แต่กรณีนี้ไม่เหมือนปกติในกรณีดังกล่าวต้องมีจุดเปลี่ยนที่กระแสจะเปลี่ยนทั้งจาก laminar เป็น turbulent และ turbulent เป็น laminar

โดยทั่วไปจะแบ่งคุณลักษณะของการไหลของสารต่าง ๆ (flow behaviour) ดังแสดงในภาพที่ 2-12



ภาพที่ 2-12 ลักษณะการไหลแบบต่าง ๆ (flow curves) ของของไหล

(<http://www.mtec.or.th/th/labs/rheology/images/pdf/rhe-6-10-46.pdf>)

คุณสมบัติการไหลของของไหลที่พบเห็นโดยทั่วไปมี 5 ประเภทดังนี้ (Atkinson & Mavittuna, 1991)

1. newtonian fluid เป็นคุณสมบัติของของไหลในอุดมคติ ที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ ที่ของไหลมีค่าความหนืดเป็นค่าคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามอัตราเฉือน (shear rate) หรือความเร็วในการกวน เช่น น้ำ น้ำเชื่อม น้ำผึ้ง น้ำผลไม้ นม น้ำมัน เป็นต้น
2. pseudoplastic เป็นคุณสมบัติของของไหลที่เมื่อของไหลมีค่าความหนืดลดลงเมื่อเพิ่มอัตราเฉือนหรือที่เรียกว่าแสดงสมบัติเป็น shear thinning เช่น น้ำผลไม้เข้มข้น โพลีเมอร์ หลอมเหลว สารละลายโพลีเมอร์ และ fermentation broth เป็นต้น
3. dilatant fluid เป็นคุณสมบัติของของไหลที่มีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราเฉือนหรือที่เรียกว่าแสดงสมบัติเป็น shear thickening เช่น น้ำแป้ง น้ำดินชั้น หาดทราย เป็นต้น

4. bingham plastic เป็นคุณสมบัติของของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอจะเกิดการไหลแบบ newtonian fluid เช่น นมช็อกโกแลต ยาสีฟัน น้ำสลิป ของเซรามิก เป็นต้น

5. plastic เป็นคุณสมบัติของของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอจะเกิดการไหลได้จะไหลแบบ pseudoplastic หรือตามโมเดลของ herschel-buckley เช่น ซอสมะเขือเทศ มายองเนส สี ดินเหนียว เป็นต้น

โครมาโตกราฟี (chromatography)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจากกระบวนการหมักหลายชนิดโดยของเหลวที่ได้จากกระบวนการหมักเข้าไปในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยสารที่เหมาะสมเพื่อทำหน้าที่เป็น stationary phase ซึ่งสามารถแยกผลผลิตที่ต้องการออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ ได้ โดยอาศัยกลไกแตกต่างกันไปตามชนิดของ stationary phase ที่ใช้ และสมบัติของผลผลิตที่ต้องการแยก นอกจากใช้ในการแยกผลผลิตแล้วยังสามารถใช้ในการทำบริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายได้อีกด้วย

Ion-exchange chromatography (Latinen & Harris, 1975)

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่ต้องการได้โดยอาศัยการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างผลผลิตกับ solid phase สารอินทรีย์ที่นิยมใช้เป็น solid phase โดยทั่วไปได้แก่ เรซิน (resin) ที่มีส่วนประกอบหลักคือ vinyl styrene copolymer ซึ่งเชื่อมอยู่กับหมู่อะตอมที่มีประจุบวกหรือประจุลบที่วงไว แบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ

ประจุลบ (anion-exchange chromatography) ประจุลบของสารตัวอย่างจะจับกับประจุบวกบนเรซินที่สูงกว่าจุด PI ของสารตัวอย่าง โดยทั่วไปเรซินที่ใช้ ได้แก่ Q-resin, a Quaternary amine, DEAE resin และ DiEthylAminoEthane

ประจุบวก (cation-exchange chromatography) ประจุบวกของสารตัวอย่างจะจับกับประจุลบบนเรซินที่ต่ำกว่าจุด PI ของสารตัวอย่าง โดยทั่วไปเรซินที่ใช้ ได้แก่ S-resin, sulfate derivatives, CM resins และ carboxylate derived ions

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Igou et al. (1974) เสนอรายงานเกี่ยวกับอุณหภูมิที่มีผลต่อการละลาย SDS ในสารละลายต่าง และระหว่างช่วงทำให้ lysate เป็นกลาง ที่อุณหภูมิต่ำ SDS มีความสามารถในการละลายลดลงและเกิดการรวมตัวของต่างสูงซึ่งส่งผลให้ SDS และโปรตีนรวมตัวกันเกิด

แขวนลอย เนื่องจากสารทำให้เป็นกลางเย็นลงถึง 4 - 5 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการรวมตัวของสารประกอบ SDS และองค์ประกอบของเซลล์ โคโรโมโซมอลดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน

Adam and Zimm (1977) ศึกษาถึงสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสลายเซลล์ pH ที่สูงกว่า 12.5 ทำให้ทั้งโครโมโซมอลดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอเสียหายได้ หรือสามารถเกิดการเสียหายอย่างถาวรในพลาสมิดดีเอ็นเอ และถ้า pH ต่ำกว่า 12 มาก ๆ การสลายเซลล์จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อยอัตราการสลายของดีเอ็นเอจะเพิ่มมากยิ่งขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (ทำการทดลองที่ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส)

Horn et al. (1995) รายงานว่ากระบวนการแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์ในขั้นตอน anion-exchange chromatography พบว่าพลาสมิดที่ได้จะมีการปนเปื้อนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอและ endotoxin ในปริมาณที่มากเกินไปที่จะนำพลาสมิดไปใช้ประโยชน์ได้ ต้องผ่านกระบวนการของ size exclusion chromatography เพื่อทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ขึ้น ก่อนจึงจะนำพลาสมิดไปใช้ประโยชน์ได้

Sofer and Hogal (1997) รายงานว่าในขั้นตอนการแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยการใช้ anion-exchange chromatography จะลดการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ oligoribonucleotide และโปรตีนออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอได้ แต่ในส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และ endotoxin ยังคงมีการปนเปื้อนในปริมาณที่มาก เพราะโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และ endotoxin มีความสามารถที่จับกับ anion exchanger ได้ดีจึงเป็นสาเหตุทำให้พลาสมิดที่ได้ไม่บริสุทธิ์ จึงเสนอแนะว่าในขั้นตอนการล้างให้ใช้ 1 M โซเดียมคลอไรด์ และ 2-3 M โซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอและ endotoxin

Thatcher et al. (1997) รายงานว่าอาร์เอ็นเอจะถูก elute เป็นอันดับแรกโดยใช้ 0.5 M salt buffer (25 mM โพแทสเซียมอะซิเตท 10 mM EDTA, 0.5 M โซเดียมคลอไรด์ pH 5.5) ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอจะถูก elute เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.75 - 1.5 M โดยใช้บัฟเฟอร์เหมือนกับอาร์เอ็นเอ

Thatcher et al. (1997) ยังรายงานอีกว่าในขั้นตอนการไหล การชะล้าง และ elute ใช้อัตราการไหลที่เท่ากัน และ รายงานว่าในขั้นตอนการล้างจะใช้ low ionic strength buffer เช่น 25 mM โพแทสเซียมอะซิเตท pH 5.5 หรือ 25 mM Tris-HCl pH 8.0 ส่วนในช่วงการ elute ต้องเพิ่มปริมาณ ionic strength ให้สูงกว่าช่วงการล้าง

Theodossiou et al. (1997) ทดลองเพื่อแยกพลาสมิด pCH110 ออกจากเซลล์ *E.coli* โดยการใช้สารแขวนลอยเซลล์ (10mM Tris/HCl 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1mM EDTA pH 8) เพื่อแขวนลอยเซลล์ จากนั้นผสมกันกับ 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 1% SDS (สารละลายต่าง) เมื่อนำไปเก็บไว้ในฟลาสก์เพื่อทำให้โครโมโซมอลดีเอ็นเอ และโปรตีนเสียสภาพเป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นสารละลายใส่ 3 M โพแทสเซียมอะซิเตท pH 5.5 เพื่อช่วยตกตะกอน โครโมโซมอลดีเอ็นเอ โปรตีนที่จับกับ SDS และสารตกอนอื่น ๆ ทำให้ตะกอนรวมตัวกัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร แล้วเก็บไว้ในที่เย็นเพื่อเข้าสู่กระบวนการกรอง หลังจากเข้าสู่การกรองโดยใช้ diatomaceous earth กับ polypropylene พบว่าได้ปริมาณพลาสมิด 30.2 % และพลาสมิดที่ได้มีความบริสุทธิ์ 65 %

Ciccolini et al. (1998) รายงานถึงปฏิกิริยาในการสลายเซลล์ เวลาที่ใช้ในการสลายเซลล์ขึ้นอยู่กับความเครียดของเซลล์ แต่ไม่มีผลกระทบต่อขนาดพลาสมิด และจำนวนการจำลองตัวเองของพลาสมิดเวลาในการสลายเซลล์นั้น เมื่อมีการรวมตัวกับต่างเป็นสาเหตุให้เกิดเสียสภาพของโปรตีน โดยน้ำหนักโมเลกุลของพลาสมิดดีเอ็นเอจะต่ำลงและโครโมโซมอลดีเอ็นเอสูงขึ้น หลังจากนั้นประมาณ 5 วินาที จะเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ในช่วงการทำให้ lysate เป็นกลางเพิ่มสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตทสารละลาย SDS จะลดลง อุณหภูมิจะต่ำลงการรวมตัวของต่างจะสูงขึ้นทำให้ SDS และโปรตีนมีรูปแบบแขวนลอย ที่เวลา 80-120 วินาที โครโมโซมจะเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามข้อแนะนำเกี่ยวกับอุณหภูมิในการสลายเซลล์ปล่อยให้มีการ relaxed พลาสมิดดีเอ็นเอขณะที่อุณหภูมิต่ำพลาสมิด จะเปิดออกสภาพเช่นนี้จะทำให้การเสียสภาพของโปรตีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

Monteiro et al. (1998) ทดลองสลายเซลล์ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 22, 37, 65 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส อาร์เอ็นเอจะเกิดการเสียสภาพและที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเกิดการเสียสภาพมากที่สุด และถูกทำลายที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส การทำให้อาร์เอ็นเอเสียสภาพต้องใช้เวลาานานสำหรับโครโมโซมอลดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอไม่เสียสภาพที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิถึง 37 องศาเซลเซียส พลาสมิดดีเอ็นเอเสียสภาพเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่จะเสียสภาพมากที่สุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

Ciccolini et al. (1999) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรีโอโลยีในขณะที่ทำให้ lysate เป็นกลางโดยใช้ *E.coli* C₆₀₀ นำมาทำการทดลองใช้สารแขวนลอยเซลล์เพื่อแขวนลอยเซลล์ 12.5

กรัมต่อมิลลิลิตร และใช้สารละลายต่างคือ 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับ 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) SDS และใช้สารทำให้เป็นกลาง คือ 3 M โพแทสเซียมอะซิเตต pH 5.5 ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยส่งเสริมการตกตะกอนของ SDS การทดลองกระทำโดยใช้สารแขวนลอยเซลล์ 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในรีโอมิเตอร์แล้วบั่นเป็นเวลา 10-20 วินาที ใส่สารละลายต่าง 4 มิลลิลิตร แล้วบั่นเป็นเวลา 100-300 วินาที หลังจากนั้นใส่สารทำให้เป็นกลาง 4 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลอง พบว่า SDS และโปรตีนจะรวมตัวจับกันเป็นตะกอน โครโมโซมอลดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจะสลายเป็นส่วนเล็ก ๆ การใช้แรงเฉือนที่ต่ำจะทำให้เซลล์มีช่องว่างมาก และล่อยขึ้นมาบริเวณผิวหน้า แต่ถ้าใช้แรงเฉือนที่สูงมากเกินไปจะทำให้การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอยากขึ้น

Prazeres et al. (1999) ทดลองใช้บัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบเป็นพันธะไฮโดรเจน หรือเป็นพันธะไอออนิก เช่น การใช้ Tris – HCl ร่วมกับ EDTA ในการแขวนลอยเซลล์ หลังจากนั้นนำมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้สารละลายต่าง 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 0.1 % SDS pH 12.5 แล้วนำ lysate มาทำการตกตะกอนเซลล์ และโปรตีนโดยใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น โพแทสเซียมอะซิเตต จากนั้นนำมาทำการแยกโดยวิธี ion-exchange chromatography และ size exclusion ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกอาร์เอ็นเอ oligoribonucleotide และโปรตีนออกมาได้แต่จะเหลือโครโมโซมอลดีเอ็นเอและ endotoxin อยู่เนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสมิดดีเอ็นเอ

Theodossiou et al. (1999) ทำการทดลองสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้เซลล์ เซลล์ใหม่หรือเซลล์ที่แช่แข็งแล้วนำมาแขวนลอยเซลล์ 120 กรัมต่อลิตร ของสารแขวนลอยเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Tris/HCl 10 mM และ EDTA 1 mM ที่ pH 8 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยต่างเพื่อให้เซลล์ปลดปล่อยพลาสมิดออกมา จากนั้นทำให้ lysate เป็นกลางโดยการเติมโพแทสเซียมอะซิเตต และทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง อัตราส่วนระหว่างปริมาตรระหว่างสารแขวนลอยเซลล์ สารละลายต่าง (0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 1 % w/v SDS) และสารทำให้เป็นกลาง (3 M potassium acetate pH 5.5) ในการทดลองคือ 1: 1: 1 ผลการทดลองพบว่าสารที่ได้ ประกอบไปด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ โครโมโซมอลดีเอ็นเอ ผลผลิตโปรตีน และ ของแข็งแห้ง โดยมีค่า 65.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.97 กรัมต่อลิตร 4.77 กรัมต่อลิตร และ 95.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Varley et al. (1999) ทดลองสลายเซลล์โดยใช้สารแขวนลอยเซลล์ 2 ลิตร ที่ได้จากการแขวนลอยเซลล์ในบัฟเฟอร์ (50 mM tris-HCl, 10 mM EDTA ปรับ pH เท่ากับ 8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ละลาย RNase A 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมลงไป) ใช้สารละลายต่าง

(0.15 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมกับ 1% SDS) 4 ลิตรใส่ลงไปเพื่อให้เซลล์แตกที่อุณหภูมิ 20 – 22 องศาเซลเซียส และหลังจากนั้นเติมสารทำให้เป็นกลาง 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย (3 M โพแทสเซียมอะซิเตท ปรับ pH เท่ากับ 5 ด้วย 10 mM EDTA) ซึ่งอัตราส่วนที่ใช้ในแต่ละช่วง คิดเป็น 1: 2: 1 พบว่า ผลผลิตรวมจากการผลิตได้พลาสมิดดีเอ็นเอ 235 มิลลิกรัม จากการผลิตใน 3 วัน การเก็บเกี่ยว *E. coli* DH1 / pTX0161 จะให้ผลผลิตพลาสมิด 1.4 มิลลิกรัมต่อค่าการ ดูดกลืนแสงมิลลิลิตร หรือปริมาณผลผลิตจาก 15.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

George (2000) และ Chamsart (2001) ทดลองสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกจาก *E. coli* โดยการแขวนลอยเซลล์ในสารแขวนลอยเซลล์ (Tris-HCl กับ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ที่ผสม RNase 10 มิลลิกรัม และเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส) เมื่อผสมสารแขวนลอยเซลล์ กับสารละลาย ต่างที่ประกอบด้วย 0.155 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับ 1 % SDS ในถึงกวนแล้วใช้อัตราเร็ว ใบพัด 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อัตราการไหล 10 ลิตรต่อนาที ใช้อัตราเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วใส่สารทำให้เป็นกลาง (3 M โพแทสเซียมอะซิเตท ผสมกับ glacial acetic acid ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.5) ที่อัตราการไหล 1 ลิตรต่อนาที ใช้อัตราเร็วใบพัด 50, 100 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ผลที่ได้พบว่าเมื่อใช้การกวนที่มีอัตราใบพัด 50, 100 และ 200 รอบต่อนาทีนั้น เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าขนาดของเศษเซลล์จะเปลี่ยนแปลงโดย เพิ่มขึ้นลดลงและคงที่ ตามลำดับ และจากการทดลองทั้งหมด พบว่าการใช้เซลล์ที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร อัตราเร็วของใบพัดในขณะทำให้ lysate เป็นกลาง 50 รอบต่อนาที และอัตราการ ไหล 30 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณ พลาสมิดสูงสุด คือ ประมาณ 0.805 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์ เปียก

Levy et al. (2000) ทำการทดลองพบว่าหลังจากการเติม SDS และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในสารแขวนลอยเซลล์ของเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด 76 กิโลเบล ความหนืดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากเติมสารละลาย SDS และโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในสารแขวนลอยเซลล์ 30 วินาที (10 mPas) หลังจากนั้นประมาณ 25 วินาที ความหนืดจะลดลงเล็กน้อย (6 mPas) ก่อนจะเพิ่มขึ้น อีกครั้งในช่วง 80 – 120 วินาที (30 - 35 mPas) และสุดท้ายความหนืดจะลดลงหลังจาก 200 – 400 วินาที (20 mPas)

Blanche et al. (2001) ศึกษาทดลองการแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์เปรียบเทียบกับ ระหว่างวิธี continuous ion-exchange chromatography กับ ion-exchange แบบธรรมดาพบว่า แบบต่อเนื่องมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ 0.7 % โครโมโซมดีเอ็นเอ 1.1 % และ open circular DNA 1.2 % เมื่อเปรียบเทียบกับแบบธรรมดามีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของ

อาร์เอ็นเอ 0.7 % โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 % และ open circular DNA 1.3 % แสดงว่าวิธีแบบต่อเนื่องให้ประสิทธิภาพของผลผลิตที่ดีกว่าแบบวิธีธรรมดาทั่วไป โดยใช้ชนิดของเรซิน และสภาวะในการทดลองเหมือนกันทุกอย่าง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลำดับการแยกของสารก่อนและหลังดังนี้ open circular DNA และอาร์เอ็นเอ จะแยกออกมาบางส่วนก่อนเป็นลำดับแรกในส่วนของการชะล้าง nicked DNA และอาร์เอ็นเอจำนวนน้อย จะแยกออกมาเมื่ออยู่ในช่วงระหว่าง 40 ถึง 60 องศาของการหมุนในส่วนการชะล้างอาร์เอ็นเอส่วนใหญ่ และ nicked DNA ที่เหลือจะแยกออกมาเมื่ออยู่ในช่วงระหว่าง 80 ถึง 100 องศาของการหมุนในส่วนการชะล้าง ส่วน supercoiled pDNA จะถูกแยกให้บริสุทธิ์ในส่วน elution ในช่วงระหว่าง 180 ถึง 240 องศาของการหมุน แสดงว่า supercoil พลาสมิดดีเอ็นเอมีความเสถียรมาก

Blanche et al. (2001) ทดสอบการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยศึกษาปริมาณพลาสมิดที่ใช้ในการ load จำนวน 3 ช่วงปริมาณคือ 17 มิลลิกรัม 28 มิลลิกรัม และ 81.5 มิลลิกรัม ในช่วงระหว่าง 180 ถึง 240 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่มีการแยก supercoiled pDNA สมบูรณ์พบว่าปริมาณพลาสมิดบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณดังนี้ 488 มิลลิกรัม 720 มิลลิกรัม และ 2550 มิลลิกรัม ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์พลาสมิด recovery ที่ได้ดังนี้ 66 %, 96.5 % และ 90 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีการ continuous ion-exchange chromatography สามารถให้ผลผลิตสูงและลดการปนเปื้อนได้ดี

Chamsart (2001) ทำการทดลองใช้สารแขวนลอยเซลล์ประกอบด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl ผสมกับ 10 mM EDTA และ RNase A100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเซลล์ 120 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) โดยสารละลายมีค่า pH 8 ทำการสลายเซลล์ในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตั้งกวนโดยใช้ถังแกว่ง (0.155 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมกับ 1 % SDS) ที่ 20 – 22 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาตรเป็น 2 เท่า ของสารแขวนลอยเซลล์แล้วเติมสารทำให้ lysate เป็นกลางที่ประกอบด้วย 3 M โพแทสเซียมอะซิเตทปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วย glacial acetic acid แล้วทำการกวน หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiagen Maxiprep และแอลกอฮอล์ในการตกตะกอน แล้วนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอน้อยกว่า 2 % นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสลายเซลล์ ในกระบวนการทำให้ lysate เป็นกลางที่มีปัจจัยเกี่ยวข้อง คือ อุณหภูมิ เวลาและการเกิดฟองอากาศ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส เวลาที่เหมาะสมคือ ภายใน 70 นาที และและการเกิดฟองอากาศไม่มีผลต่อปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วของใบพัด (100-1,000

รอบต่อนาที) สำหรับการสลายเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กไม่มีผลกระทบต่อผลผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอ และไม่ทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอเสียหาย ซึ่งข้อมูลนี้มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการค้า

Chamsart (2001) ได้ศึกษาการสกัดพลาสมิดทั้ง 3 ขั้นตอน ได้แก่ การแขวนลอยเซลล์ การสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้เป็นกลาง ในถังกวนขนาด 5 ลิตร ที่ความเร็วใบพัดต่าง ๆ กัน และที่ความเร็วใบพัดคงที่ 125 รอบต่อนาที ตลอดทั้ง 3 ขั้นตอน พบว่าขั้นตอนการสลายเซลล์ ระบบต้องการพลังงานสูงถึง 3 เทา ของขั้นตอนการสลายเซลล์และการทำให้เป็นกลาง เนื่องจาก lysate มีความหนืด และ viscoelastic สูงจึงทำให้ต้องใช้พลังงานสูงในขั้นตอนการกวน เวลาในการกวนสำหรับขั้นตอนการ สลายเซลล์ด้วยด่างคือ 3.30 นาที และ 2.00 นาที สำหรับการทำให้เป็นกลาง ผลโดยรวมแล้วพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดพลาสมิดสูงถึง 90 % และมีโครโมโซมอลดีเอ็นเอปนเปื้อนน้อยกว่า 2 % และยังพบว่าเซลล์ที่มีจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอ็นเอสูงเช่น สูงกว่า 1,600 ชุดต่อหนึ่งเซลล์ การสกัดจะยิ่งทำได้ง่ายขึ้นเพราะความหนืด และ viscoelasticity ของ lysate ลดลง เมื่อเทียบกับพวกจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่น้อยกว่า ซึ่งเป็นการค้นพบที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตพลาสมิดในระดับอุตสาหกรรม

Chamsart (2001) พบวิธีการกรองแบบใหม่ที่ดีกว่าเดิม (bag filtration) เป็นการกรองโดยการเติมตัวช่วยกรอง (fillteraid) ที่เป็น diatomaceous earth ลงไปใน neutralised suspension ก่อนการกรองเพื่อป้องกันการอุดตันของระบบกรอง ซึ่งทำให้ได้ flux rate สูงสุด คือ 20 ลิตรต่อนาที ซึ่งได้จากการกรอง neutralised suspension ที่ได้จากการสลายเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารแขวนลอยเซลล์ 120 กรัมต่อลิตร และการกรองที่เติมตัวช่วยกรอง 30 กรัมต่อลิตร นี้พบว่าให้ flux rate สูงกว่าการกรองแบบธรรมดาถึง 3 เทา ปริมาณผลผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ 80 % และมีการปนเปื้อนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอน้อยกว่า 2 % เช่นกัน ยังไม่มีรายงานการนำวิธีการนี้ไปใช้ผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอในระดับอุตสาหกรรม