# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## การผลิตเซลล์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก จ)

**1. การผลิตเซลล์แบคทีเรียแบบกะ** (batch fermentation)

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แบบกะในอาหารชนิด complex medium (ภาคผนวก ค) โดยใช้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 6.8 – 7.0 อัตราการกวน 200 – 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และ ควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักไม่น้อยกว่า 20 % ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าในถังหมัก 5 และ 10 ลิตร ชั่วโมงที่ 12 เซลล์มีการเจริญสูงที่สุด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$) ได้ 16.4 และ 20.6 ตามลำดับ ส่วนค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) เท่ากับ 10.2 และ 12.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ที่นับได้โดยประมาณเท่ากับ $92.8 \times 10^7$ และ $142.8 \times 10^8$ เซลล์ต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ที่นับได้ในถัง 5 ลิตร และ10 ลิตร มีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันไปในทิศทางเดียวกันซึ่งการเลี้ยงเซลล์ในถัง 10 ลิตร เซลล์จะมีการเจริญที่สูงกว่า ซึ่งพบว่าเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 10 ไปปริมาณเซลล์จะเจริญช้าลงทั้งนี้เนื่องจากอาหารในถังหมักที่เป็นแหล่งคาร์บอนใกล้จะหมดทำให้เซลล์ได้รับอาหารไม่เพียงพอเซลล์จึงเริ่มหยุดการเจริญ (ภาคผนวก จ)

**2. การผลิตเซลล์แบคทีเรียแบบครั้งคราว** (fed-batch fermentation)

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แบบครั้งคราวในอาหารชนิด complex medium (ภาคผนวก ค) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนอาหารที่ใช้ในการเติมเป็นชนิด complex feed medium (ภาคผนวก ค) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 6.8 – 7.0 อัตราการกวน 200 – 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และ ควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักไม่น้อยกว่า 20 % ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ทำการทดลอง 2 ครั้ง เริ่มทำการเติมสารอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 อัตราการไหลเท่ากับ $Fo \exp(\mu t)$ โดยที่อัตราการไหลจะเพิ่มขึ้นในแต่ละชั่วโมง เพราะเมื่อเวลามากขึ้นปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นทำให้ต้องใช้อาหารเพิ่มมากขึ้น และจากการทดลอง พบว่าทั้งสองการทดลองในชั่วโมงที่ 15 เซลล์มีการเจริญสูงที่สุดวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 18.2 และ 18.4 ตามลำดับ ส่วนค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 12 และ 10.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้โดยประมาณเท่ากับ $150 \times 10^8$ และ $345 \times 10^8$ เซลล์ต่อลิตร ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ที่นับได้ในถัง 10 ลิตร ทั้งสองการทดลองมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันไปในทิศทางเดียวกันซึ่งจะสังเกตเห็นว่าผ่านชั่วโมงที่ 10 ไปปริมาณเซลล์แบคทีเรียจะเจริญช้าลงเพราะอาหารในถังหมักใกล้จะหมดจึงเริ่มมีการไหลอาหารลงไปในถังหมักเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเซลล์แบคทีเรียก็จะมีการเจริญที่สูงขึ้นเล็กน้อย (ภาคผนวก จ)

3. **การผลิตเซลล์แบคทีเรียแบบต่อเนื่อง** (continuous fermentation)

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แบบต่อเนื่อง ในอาหารชนิด complex medium โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนอาหารที่ใช้ในการเติมเป็นชนิด complex feed medium ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 6.8 – 7.0 อัตราการกวน 200 – 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และ ควบคุมปริมาณออกซิเจนในถังหมักไม่น้อยกว่า 20 % ทำการทดลองเป็นเวลา 45 ชั่วโมงในถังหมักขนาด 5 ลิตร เริ่มทำการเติมอาหารเข้าถังหมักพร้อมทั้งนำอาหารออกในอัตราไหลที่เท่ากัน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 ในอัตราที่ต่อเนื่องจนสิ้นสุดการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอัตราการไหล F = DV, D คือ อัตราการเจือจาง ส่วน V คือ ปริมาตรของอาหารในถังหมักจากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่วัดได้เท่ากับ 16 ในชั่วโมงที่ 34 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.2 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 15 และจำนวนเซลล์ที่นับได้โดยประมาณมีค่าสูงสุดเท่ากับ $60 \times 10^7$ เซลล์ต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 27 และ 31 จากการทดลองพบว่าเซลล์จะมีการเจริญอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งผ่านชั่วโมงที่ 12 ไปเซลล์ก็จะมีอัตราการเจริญช้าลงและเริ่มคงที่ต่อเนื่องจนกระทั่งครบ 45 ชั่วโมง (ภาคผนวก จ)

## ส่วนประกอบและการทำงานของชุด In-Line Static Mixer (ISM)

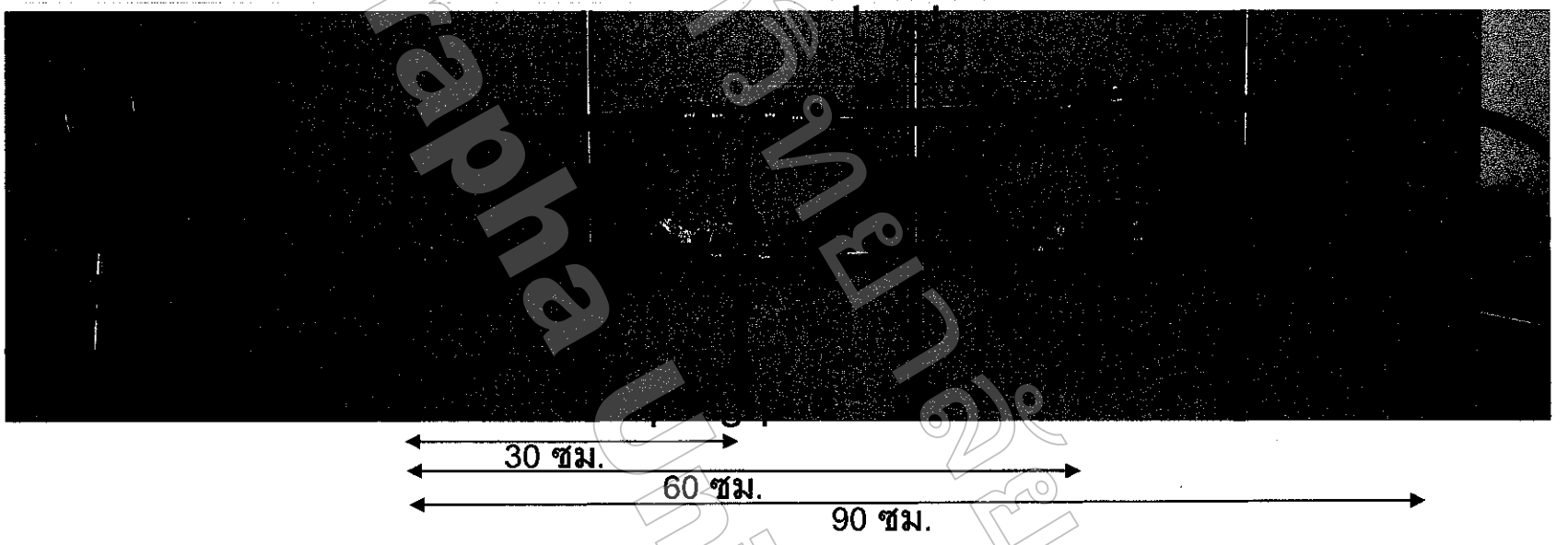
จากการทดลองสร้างชุด static mixer สำหรับทำการสลายเซลล์แบคทีเรียภายในท่อประกอบด้วยท่ออะคริลิคความยาว 30 เซนติเมตร และไส้ In-Line Static Mixer ชนิด 24 elements เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ความยาว 24 เซนติเมตร โดย In-line static elemet จะถูกสอดไว้ภายในท่ออะคริลิค ซึ่ง In-Line Static Mixer ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นส่วนสำหรับการสลายเซลล์ (lysis) และส่วนที่สองสำหรับการทำให้ lysate เป็นกลางแต่ละส่วนประกอบด้วยท่อจำนวน 3 ท่อน แต่ละท่อนยาว 30 เซนติเมตร เชื่อมต่อกันด้วยข้อต่อรูปตัวทีเป็นส่วนที่ใช้เก็บตัวอย่างในแต่ระยะทาง คือ ที่ 30, 60 และ 90 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 4-1) ในการสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายในท่อโดยการใช้ In-Line Static Mixer ที่สร้างขึ้นโดยทำการทดลอง 3 สภาวะ คือ ที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension solution, P1):

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารละลายด่างแก่ (alkaline solution, P2): สารทำให้เป็นกลาง (neutralised solution, P3) ที่อัตราการไหล 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

จากภาพที่ 4-1 อธิบายได้ดังนี้ ในส่วนแถวบนของท่อแก้วจะเป็นส่วนที่ทำการไหลเซลล์แขวนลอยและสารละลายด่างแก่ผ่านข้อต่อรูปตัวทีโดยใช้ peristaltic pump เพื่อให้สารทั้งสองมาเจอกันเพื่อเริ่มกระบวนการสลายเซลล์ภายในท่อแก้วที่มี In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างนี้มีระยะทางทั้งหมด 90 เซนติเมตร แบ่งออกเป็น 3 ส่วนส่วนละ 30 เซนติเมตรดังภาพ ส่วนในแถวล่างของท่อแก้วเป็นส่วนที่ทำการไหลสารละลายที่ทำให้ lysate เป็นกลางให้มาผสมกับส่วน lysate ที่ไหลต่อเนื่องมาจากการสลายเซลล์ด้วยด่าง ซึ่งขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางมีระยะทางทั้งหมด 90 เซนติเมตร แบ่งออกเป็น 3 ส่วนส่วนละ 30 เซนติเมตร เหมือนกับขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง ส่วนปลายท่อแก้วท่อนสุดท้ายจะต่อกับเครื่องกรองดังภาพ ซึ่งเครื่องกรองนี้จะใช้ระบบแรงดันที่เกิดจากการไหลของสารผสมที่ผ่านท่อแก้วที่มี In-Line Static Mixer เพื่อใช้กรองพวกเศษเซลล์และ neutralised flocs กระบวนการสลายเซลล์นี้จะเป็นแบบต่อเนื่องทั้งระบบเริ่มตั้งแต่การสลายเซลล์ด้วยด่าง การทำให้ lysate เป็นกลางและการกรอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-1 ชุด In-Line Static Mixer และระบบการกรองที่สร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับการสลายเซลล์ การทำให้ lysate เป็นกลาง และการกรองสำหรับการทดลอง (P1: Suspension buffer, P2: Lysis buffer และ P3: Neutralisation Buffer)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

## การสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใน In-Line Static Mixer

การสลายเซลล์เพื่อสกัดพลาสมิดโดยการใช้ด่างแก่ทำให้เซลล์แตก จากนั้นตกตะกอนเศษเซลล์และโปรตีนอย่างต่อเนื่องภายในท่อ In-Line Mixer ที่สอดใส่ static element ทำโดยการไหลเซลล์แขวนลอย (ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ของสารแขวนลอยเซลล์): สารละลายด่างแก่ผสม SDS: สารทำให้เป็นกลาง ที่มีสัดส่วนอัตราการไหลต่าง ๆ กัน (มิลลิลิตรต่อนาที) ของสารทั้ง 3 ชนิดโดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังตารางข้างล่าง โดยทำการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำส่วนตัวอย่างหลอดควบคุม (control) เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณพลาสมิดที่ได้กับการสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใน In-Line Static Mixer ทำโดยการสลายเซลล์ในหลอด vial โดยใช้สารแขวนลอยเซลล์ สารละลายด่างแก่และสารทำให้เป็นกลางเหมือนกับการสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใน In-Line Static Mixer

ตารางที่ 4-1 อัตราการไหลสาร (มิลลิลิตรต่อนาที) ในการทดลองการสลายเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใน In-Line Static Mixer

| การทดลอง | เซลล์แขวนลอยในสารแขวนลอยเซลล์ | สารละลายด่างแก่ผสม SDS | สารทำให้เป็นกลาง |
|---|---|---|---|
| การทดลองที่ 1 | 125 | 250 | 125 |
| การทดลองที่ 2 | 250 | 500 | 250 |
| การทดลองที่ 3 | 500 | 1,000 | 500 |

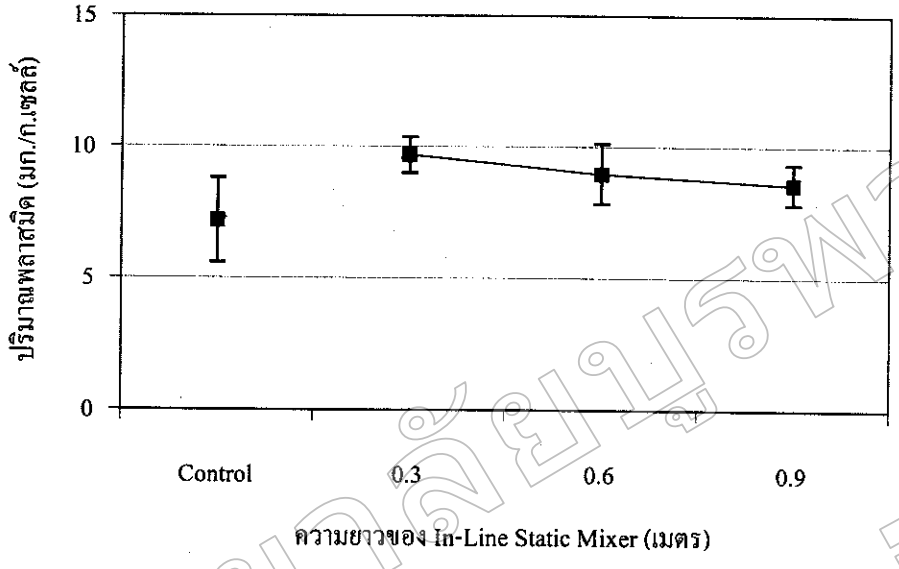
ระยะทางร่วมสำหรับขั้นตอนการสลายเซลล์และขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางมีความยาวขั้นตอนละ 90 เซนติเมตร นับตั้งแต่จุดเริ่มต้นของการไหลเซลล์แขวนลอยให้เข้าไปเจอกับ สารละลายด่างแก่และจุดเริ่มต้นของการไหลสารทำให้เป็นกลาง ตามลำดับ ในขั้นตอนของทั้งการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้เป็นกลาง เก็บตัวอย่างของ lysate ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับ และเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับเช่นกัน เก็บตัวอย่างที่แต่ละระยะทาง ๆ ละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ต่อไป

ผลการทดลองที่ 1 ทำการไหลสารแขวนลอยเซลล์และสารละลายด่างดังรูปที่ 4-1 โดยการใช้ peristaltic pumps เพื่อให้สารทั้งสองผสมกันผ่าน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหล

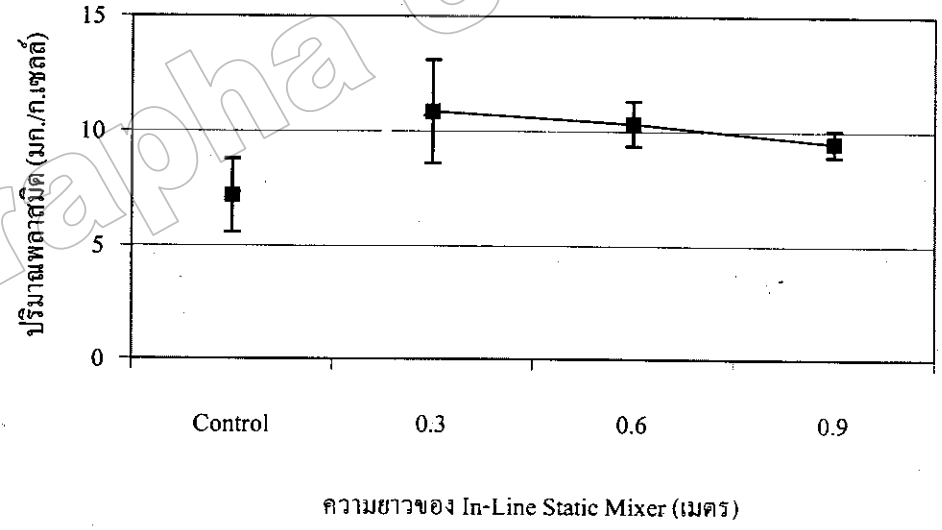
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อสารทั้งสองเจอกันจะเป็นสีแดงเนื่องจากมีการใส่ฟีนอฟทาลีนเป็น indicator ผสมลงในสารแขวนลอยเซลล์ซึ่งเป็นจุดที่เริ่มเกิดการสลายเซลล์ด้วยด่างปัจจัยที่มีผลต่อการสลายเซลล์ที่เกิดขึ้นประกอบด้วย อัตราการไหลของสาร 2 ชนิด ระยะทางที่สารทั้ง 2 ผสมกันและระยะเวลาในการสลายเซลล์ สารทั้ง 2 ผสมเป็นเนื้อเดียวกันสังเกตจากสีที่เกิดขึ้น ซึ่งระยะทาง 30 เซนติเมตรก็เพียงพอต่อการสลายเซลล์ เพราะระยะทางที่มากขึ้นปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอลดลงและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ด้วย 0.155 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ผสม 1 % SDS ประมาณ 2 วินาที การสลายเซลล์ที่สมบูรณ์เกิดขึ้นโดยใช้เวลาสั้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการสลายเซลล์ในถังกวนที่ใช้เวลาในช่วง 2-10 นาที (Chamsart, 2001) การสลายเซลล์ถึงจะเกิดขึ้นสมบูรณ์และปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ก็มีปริมาณต่ำกว่าการสลายเซลล์ใน In-Line Static Mixer จากผลการศึกษาการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดเฉลี่ย 9.68, 8.97 และ 8.57 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับจากการทดสอบทางสถิติพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนการทำให้ lysate เป็นกลางทำการไหลสารทำให้เป็นกลางโดยการใช้ peristaltic pump ให้ไหลเข้าไปใน In-Line Static Mixer เพื่อผสมกับ lysate ขณะที่ไหลผ่านมาจากขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง จากผลการศึกษาการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร พบว่าทำให้ได้ปริมาณพลาสมิดเฉลี่ย 10.85, 10.34 และ 9.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2 และ 4-3) เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้ปริมาณพลาสมิด 7.19 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ในการสลายเซลล์ภายในท่อ In-Line Mixer มากกว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เมื่อนำปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากระยะทางทั้ง 3 ระยะทางมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 3 ระยะทางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นั่นหมายความว่าการทำให้ lysate เป็นกลางเสร็จสมบูรณ์ตั้งแต่ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



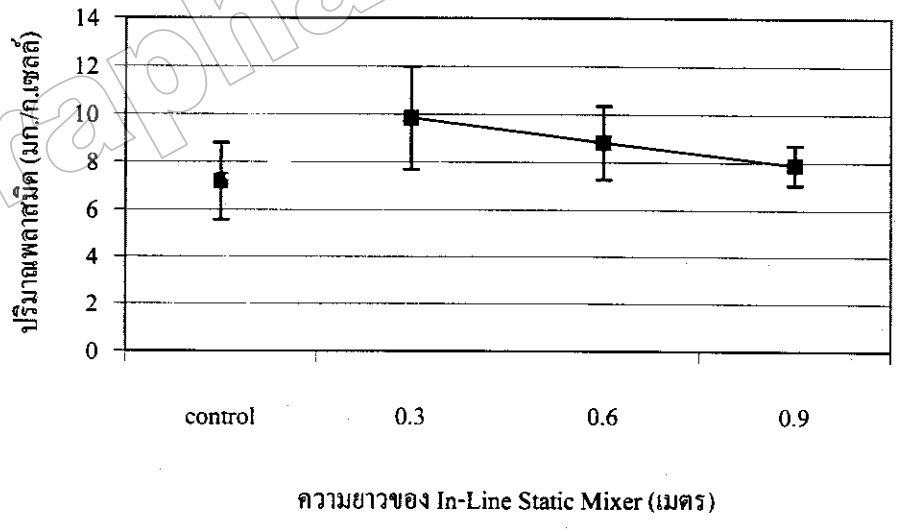

ภาพที่ 4-2 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)




ภาพที่ 4-3 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

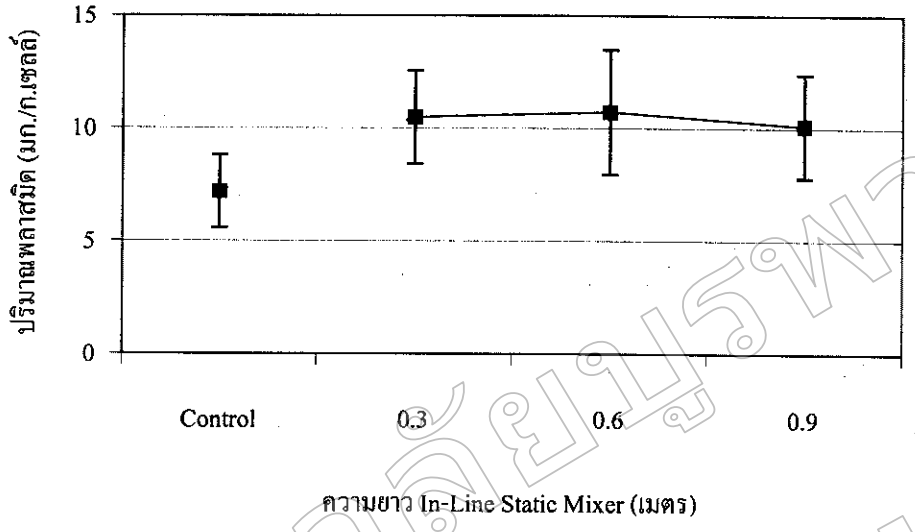
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการทดลองที่ 2 ทำการไหลสารแขวนลอยเซลล์และสารละลายด่างดังรูปที่ 4-1 โดยการใช้ peristaltic pumps เพื่อให้สารทั้งสองผสมกันผ่าน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหล 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อสารทั้งสองเจอกันจะเป็นสีแดงซึ่งเป็นจุดที่เริ่มเกิดการสลายเซลล์ด้วยด่าง จากผลการศึกษาการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดเฉลี่ย 9.83, 8.81 และ 7.88 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 3 ระยะทางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการทำให้ lysate เป็นกลางทำการไหลสารทำให้เป็นกลางโดยการใช้ peristaltic pump ให้ไหลเข้าไปใน In-Line Static Mixer เพื่อผสมกับ lysate ขณะไหลผ่านมาจากขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างจากผลการศึกษา การทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร พบว่าทำให้ได้ปริมาณพลาสมิดเฉลี่ย 10.48, 10.70 และ 10.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-4 และ 4-5) เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ที่ได้ปริมาณพลาสมิด 7.19 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ในการสลายเซลล์ภายในท่อ In-Line Static Mixer มากกว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองเมื่อนำปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากระยะทางทั้ง 3 ระยะทางมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 3 ระยะทางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ




ภาพที่ 4-4 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

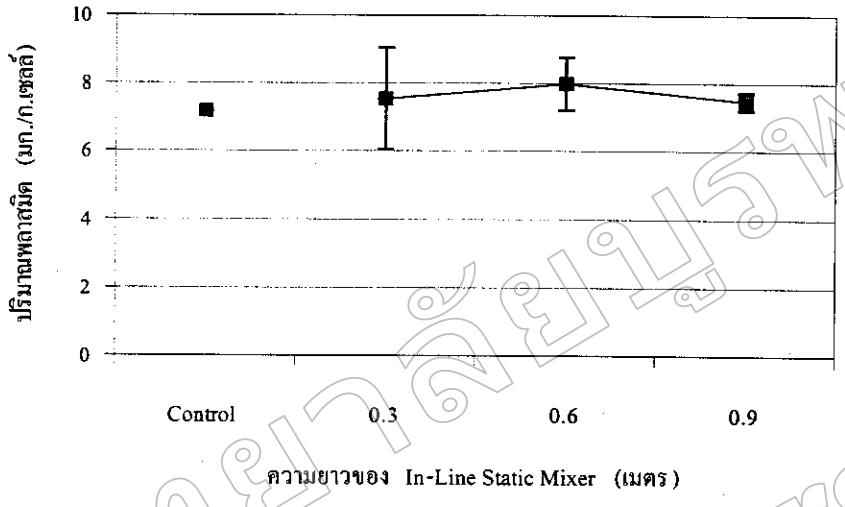
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



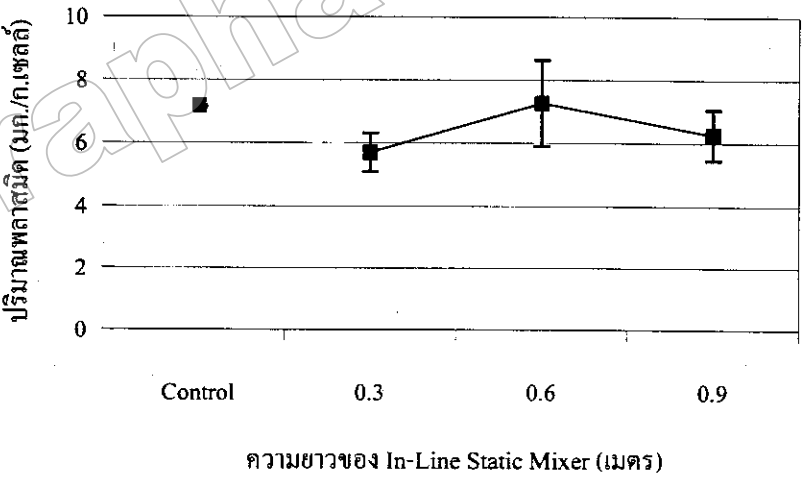

ภาพที่ 4-5 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

ผลการทดลองที่ 3 ทำการไหลสารแขวนลอยเซลล์และสารละลายด่างดังรูปที่ 4-1 โดยการใช้ peristaltic pumps เพื่อให้สารทั้งสองผสมกันผ่าน In-Line Static Mixer ที่อัตราการไหล 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อสารทั้งสองเจอกันจะเป็นสีแดงซึ่งเป็นจุดที่เริ่มเกิดการสลายเซลล์ด้วยด่าง จากผลการศึกษาการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดเฉลี่ย 5.43, 5.75 และ 5.38 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 3 ระยะทางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการทำให้ lysate เป็นกลางทำการไหลสารทำให้เป็นกลางโดยการใช้ peristaltic pump ให้ไหลเข้าไปใน In-Line Static Mixer เพื่อผสมกับ lysate ขณะที่ไหลผ่านมาจากขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง จากผลการศึกษาการทำให้ lysate เป็นกลางการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร พบว่าทำให้ได้ปริมาณพลาสมิดเฉลี่ย 4.11, 5.24 และ 4.77 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-6 และ 4-7) เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้ปริมาณพลาสมิด 5.18 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ในการสลายเซลล์ภายในท่อ In-Line Mixer มีปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอใกล้เคียงในหลอดทดลองเมื่อนำปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้

จากระยะทางทั้ง 3 ระยะทางมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 3 ระยะทางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ




ภาพที่ 4-6 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายต่างแก่ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)




ภาพที่ 4-7 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

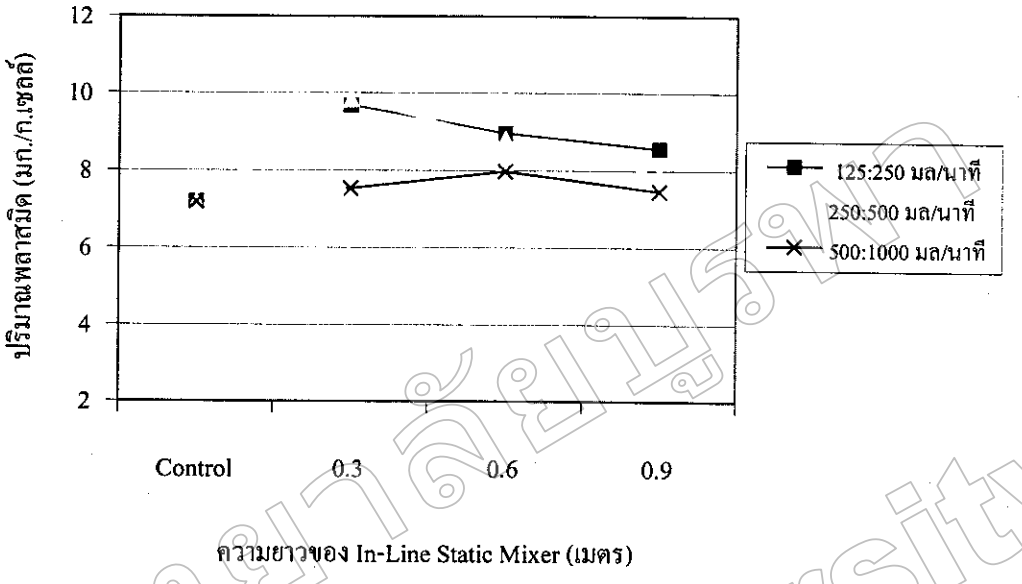
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการศึกษาทั้ง 3 การทดลอง (ภาพที่ 4-8 และ 4-9) การสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer จะสมบูรณ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก คืออัตราการไหลของสารทั้ง 2 ชนิด ระยะทางที่สารทั้ง 2 ผสมกันและระยะเวลาในการสลายเซลล์ ซึ่งอัตราการไหลที่ 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ผลผลิตของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สูงกว่าอัตราการไหลที่ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที และที่ระยะทาง 30 เซนติเมตรของอัตราการไหลที่ 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ผลผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอสูงขึ้นเมื่อระยะทางเพิ่มขึ้น (มากกว่า 30 ซม.เป็นต้นไปดูปริมาณพลาสมิดที่ระยะทาง 60 และ 90 เซนติเมตร) ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอจะลดลงและระยะเวลาในการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer ที่เหมาะสมอย่างน้อยประมาณ 2 วินาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งระยะทางที่ยาวขึ้นและเวลาที่นานขึ้นมีผลทำลายปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ แต่ที่การทดลอง 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่ำ เพราะเวลาที่สารทั้งสองผสมกันใช้เวลาเพียง 0.94 วินาทีทำให้การสลายเซลล์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ (เวลาที่เหมาะสมประมาณ 2 วินาที) ทำให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสลายพลาสมิดและการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางของ In-Line Static Mixer เพียง 30 เซนติเมตร ที่อัตราการไหล125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ก็เพียงพอต่อกระบวนการสกัดพลาสมิดส่วนที่อัตราการไหล 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจะได้ผลดีที่ระยะทาง 30 เซนติเมตรขึ้นไป เพราะที่ระยะทางเพียง 30 เซนติเมตร lysate ยังเป็นกลางได้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้สีที่เกิดจากการสลายเซลล์ด้วยด่างจะผสมกันได้ดีที่ระยะทาง 10 เซนติเมตรเป็นต้นไปและเริ่มผสมเป็นเนื้อเดียวกันที่ระยะ 20 เซนติเมตร ดังรูป 4-10 สีที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างระยะทาง 30 และ 60 เซนติเมตร แต่ที่ระยะทาง 60 และ 90 เซนติเมตร จะมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนโดยที่ระยะทาง 90 เซนติเมตร สีเริ่มใสขึ้นดังแสดงในรูป 4-11 ซึ่งสีจะมีส่วนช่วยให้เห็นว่าระยะทางเท่าไรที่การสลายเซลล์เกิดขึ้นได้ดีเช่นที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร จะเห็นว่าสารผสมมีความการเข้มข้นและหนืดมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะทาง 90 เซนติเมตร ที่สารผสมเริ่มใสและเมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอก็พบว่าที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สูงกว่าระยะทาง 90 เซนติเมตร เป็นต้น ทั้งนี้สีที่เกิดขึ้นก็จะแตกต่างกันด้วยที่อัตราการไหลที่ต่างกัน

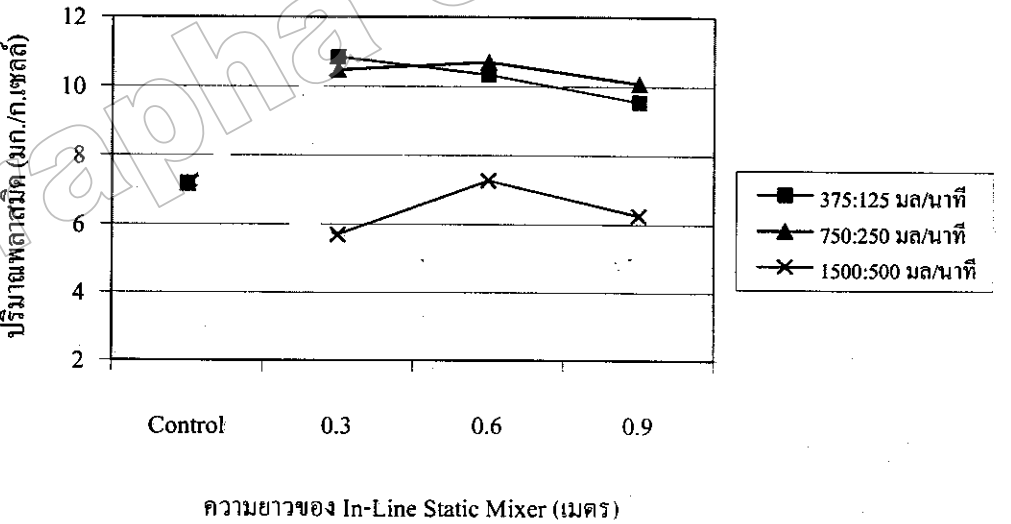
การทำให้ lysate เป็นกลางที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที จะเห็นว่าสีจะผสมกันได้ดีเป็นเนื้อเดียวกันสมบูรณ์ที่ระยะทาง 30, 25 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้การทำให้ lysate เป็นกลางได้สมบูรณ์ขึ้นอยู่

กับอัตราการไหลของสารทั้ง 2 ชนิด ระยะทางที่สารทั้ง 2 ผสมกันและระยะเวลาในการทำให้ lysate เป็นกลางจากการศึกษาพบว่าที่อัตราการไหล 375: 125, 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ปริมาณพลาสมิดที่สูงกว่าที่อัตราการไหล 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที และที่ระยะทาง 30 เซนติเมตรก็เพียงพอต่อการทำให้ lysate เป็นกลาง เมื่อระยะทางเพิ่มขึ้นปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จะลดลง นอกจากนี้ระยะเวลาที่ ทำให้ lysate เป็นกลางที่อัตราการไหล 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร ใช้เวลาในการทำให้ lysate เป็นกลาง 2.83, 1.41 และ 0.71 วินาที ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าที่อัตราการไหล 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ใช้เวลาเพียง 0.71 วินาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่ำเพราะระยะเวลาสั้นทำให้ lysate เป็นกลางได้ไม่สมบูรณ์ และอัตราการไหลของสารที่สูงเกินไปทำให้การผสม และการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์แขวนลอยกับสารละลายด่างแก่ในขั้นตอนการสลายเซลล์และ lysate กับสารทำให้เป็นกลางในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางเกิดขึ้นได้ไม่ดี เนื่องจากการผสมกันยังไม่สมบูรณ์ส่วนประกอบต่าง ๆ ก็ถูกชะออกจากกระบวนการ (wash out) จึงทำให้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการทดลองที่ 1 และ 2 เมื่อนำปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากอัตราการไหลทั้ง 3 การทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากอัตราการไหล 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่อัตราการไหล 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที แตกต่างกับอัตราการไหล 125: 250: 125 และ 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ซ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-8 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายต่างแก่ 125: 250, 250: 500 และ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)




ภาพที่ 4-9 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ กันที่ได้จากอัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 4-10 ระยะทางสีผสมของ lysate ที่อัตราการไหลต่าง ๆ กันที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร

ก. อัตราการไหลของ lysate ที่ 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที

ข. อัตราการไหลของ lysate ที่ 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที

ค. อัตราการไหลของ lysate ที่ 500: 1000 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ 4-2 อัตราไหลของสารทั้งสองที่ผสมกัน และอัตราเร็วขณะการสลายเซลล์ด้วยด่างผ่าน In-Line Static Mixer ที่สภาวะต่างกัน

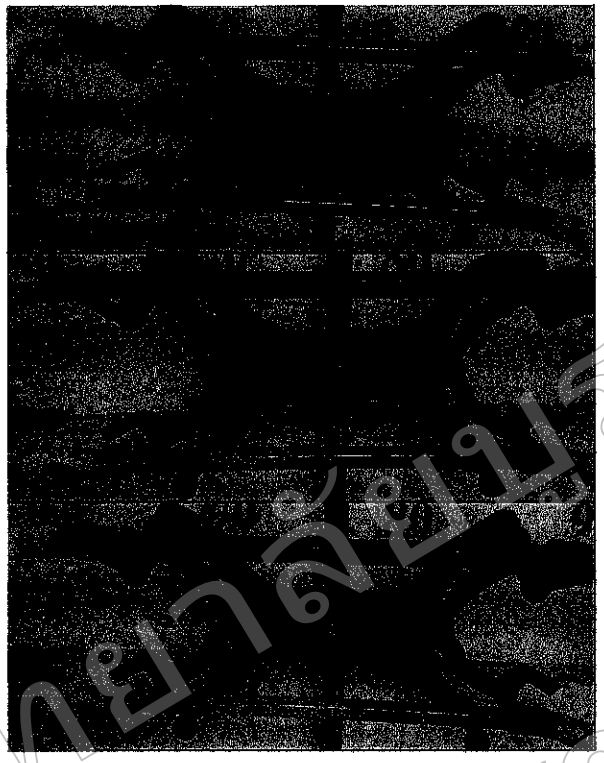
| อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารลายด่าง (มิลลิลิตรต่อนาที) | อัตราการไหลของ lysate (มิลลิลิตรต่อนาที) | อัตราเร็ว (เมตรต่อวินาที) | เวลาที่เซลล์และสารละลายด่างทำปฏิกิริยากัน (residence time (วินาที) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 125: 250 | 375 | 0.08 | 3.77 | 7.54 | 11.31 |
| 250: 500 | 750 | 0.16 | 1.88 | 3.77 | 5.56 |
| 500: 1,000 | 1,500 | 0.32 | 0.94 | 1.88 | 2.83 |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ก

ข

ค



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

ก. อัตราการไหลของ lysate และ neutralised suspension ที่ 125: 250 และ 375: 125 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

ข. อัตราการไหลของ lysate และ neutralised suspension ที่ 250: 500 และ 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

ค. อัตราการไหลของ lysate และ neutralised suspension ที่ 125: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

ภาพที่ 4-10 และ 4-11 ระยะทางสีผสมของ lysate และ neutralised suspension พบว่าที่อัตราการไหลของ lysate ที่ 125: 250, 250: 500 และ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร สีของ lysate จะผสมกันได้เป็นเนื้อเดียวกันที่ระยะทาง 20, 15 และ 10 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 4-10) ส่วนที่ระยะทาง 90 เซนติเมตรที่อัตราการไหลของ lysate 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที มีสีของ lysate เข้มที่สุดส่วนที่ระยะทาง 90 เซนติเมตร สีของ lysate จางมากที่สุดส่วนขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่อัตราการไหลของ neutralised suspension

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร neutralised suspension จะผสมกันได้ดีที่ระยะทาง 30, 20 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับซึ่งความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะสอดคล้องกับค่าความหนืดที่วัดได้ คือสีเข้มค่าความหนืดจะสูงสีจางค่าความหนืดจะต่ำ

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

| อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง (มิลลิลิตรต่อนาที) | อัตราการไหลของ neutralised suspension (มิลลิลิตรต่อนาที) | ความเร็ว (เมตรต่อวินาที) | เวลาที่ lysate และสารทำให้เป็นกลางทำปฏิกิริยากัน (วินาที) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0.3 | 0.6 | 0.9 |
| 375: 125 | 500 | 0.11 | 2.83 | 5.65 | 8.48 |
| 750: 250 | 1,000 | 0.21 | 1.41 | 2.83 | 4.24 |
| 1,500: 500 | 1,500 | 0.42 | 0.71 | 1.41 | 2.12 |

ตารางที่ 4-2 และ 4-3 อัตราการไหลของสารผสมและอัตราเร็วขณะการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer ของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่: สารทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ซึ่งเวลาที่สารแขวนลอยเซลล์และสารละลายด่างแก่เริ่มทำปฏิกิริยากันได้ดีประมาณ 2 วินาที ส่วนเวลาที่ lysate และสารทำให้เป็นกลางทำปฏิกิริยากันได้ดีประมาณ 1.5 วินาที ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารผสมมีผลต่อปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ คือถ้าเวลาน้อยกว่า 1.5 และ 2 วินาที ในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่และการทำให้ lysate เป็นกลางปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณต่ำและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารผสมที่มากเกินไปปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอก็จะมีปริมาณต่ำเช่นกัน เพราะเวลาที่น้อยเกินไปสารผสมยังทำปฏิกิริยากันได้ไม่สมบูรณ์ทำส่วนประกอบต่าง ๆ ถูกชะออกไป ส่วนเวลาที่มากเกินไปสารผสมจะถูกแรงเฉือนของ In-Line Static Mixer และสารละลายด่างแก่ทำลายมากขึ้นมีผลทำให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ลดลง

จากการทดลองนี้อธิบายได้ว่าอัตราการไหลที่เหมาะสมของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างในขั้นตอนการสลายเซลล์อยู่ในช่วงอัตราการไหลที่อัตราส่วน 125: 250 และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจะทำให้ผลผลิตของพลาสมิดที่สูงรวมทั้งช่วงอัตราการไหลของ lysate: อัตราการไหลสารทำให้เป็นกลางที่อัตราส่วน 375: 125 และ 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ในขั้นตอนการทำให้เป็นกลางก็ให้ผลผลิตที่สูงเช่นกัน เพราะระยะเวลาและระยะทางการผสมกันของสารที่เหมาะสมที่สุด

1. **คุณสมบัติทางรีโอโลยี**

**1.1 การสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่อง**

ผลการศึกษาความหนืด (viscosity) ของ lysate จากการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ที่อัตราการไหลต่าง ๆ กัน และที่ระยะทางต่าง ๆ กัน (ภาพที่ 4-12 ถึง 4-13 และ ภาพที่ 4-4) ศึกษาคุณสมบัติของ neutralised suspension ที่ได้จากการไหลของ lysate: สารที่ทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล และระยะทางต่าง ๆ (ภาพที่ 4-14 ถึง 4-15 และ ภาพที่ 4-5)

ตารางที่ 4-4 ค่า Re ที่อัตราการไหลของ lysate ที่ 125: 250, 250: 500 และ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร โดยนำค่าความหนืดที่วัดได้ไปคำนวนหาค่า Re (ภาคผนวก ฌ) ดูลักษณะการไหลของสารผสมมีลักษณะการไหลแบบใด พบว่าที่อัตราการไหลของ lysate 125: 250, 250: 500 และ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร มีลักษณะการไหลแบบ laminar เพราะค่า Re ที่คำนวณได้น้อยกว่า 950

จากกราฟภาพที่ 4-12 และ 4-13 ความเครียดเฉือนและความหนืดของ lysate ที่ได้จากการสลายเซลล์แบคทีเรียด้วยด่างขึ้นกับดีเอ็นเอเป็นสำคัญค่าความหนืดของ lysate ลดลงตามระยะทางที่เพิ่มขึ้นและเวลาที่นานขึ้น และอัตราการไหลที่สูงขึ้นด้วยซึ่งระยะทางและเวลาในการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ และอัตราการไหลมีผลต่อโมเลกุลดีเอ็นเอและค่าความหนืด จากภาพที่ 4-13 (a) ที่อัตราการไหล 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร มีค่าความหนืดสูงกว่าที่ระยะทาง 60 และ 90 เซนติเมตร ตามลำดับ เพราะที่ระยะทางมากขึ้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือเสียสภาพ เนื่องจากระยะทางยาวดังนั้นเวลาที่ดีเอ็นเอถูกแรงเฉือนของ In-Line Static Mixer และด่างทำลายนานขึ้นทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลง ดังนั้นความหนืดจึงลดลง สังเกตได้จากสีที่เกิดขึ้นจากการทดลองที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร จะมีสีเข้มเมื่อระยะทางเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 90 เซนติเมตร ระดับความเข้มของสีจะลดลงและใสขึ้น เมื่อนำตัวอย่างที่ระยะทางทั้ง 3 มาวัดค่าความหนืด พบว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร มีค่าความหนืดสูงที่สุด ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับค่าความหนืด คือถ้าความหนืดสูงสีเข้มความหนืดต่ำสีจาง และค่า Re มีรูปแบบการไหลของของเหลวภายในท่อ In-Line Static Mixer เป็นแบบ laminar

การทดลองที่อัตราการไหล 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ดังภาพที่ 4-13 (b) ที่ระยะทาง 30 และ 60 เซนติเมตร มีความหนืดที่ใกล้เคียงกันมากเนื่องมาจากระยะเวลาที่สารทั้งสองผสมกันที่ระยะทาง 30 และ 60 เซนติเมตรมีค่า 1.88 และ 3.77 วินาที ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งจากการศึกษา พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้สารทั้งสองผสมกันได้ดีที่สุดในการสลายเซลล์ด้วยด่างประมาณ 2 วินาที ดังนั้นความหนืดที่วัดได้ของระยะทางทั้งสองจึงมีค่าที่ใกล้เคียงกันโดยที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร มีค่าความหนืดที่สูงกว่าเล็กน้อย เพราะที่ระยะทางมากขึ้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือเสียสภาพ เนื่องจากระยะทางยาวดังนั้นเวลาที่ดีเอ็นเอถูกแรงเฉือนของ In-Line Static Mixerและด่างทำลายนานขึ้นทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลง ดังนั้นความหนืดจึงลดลงและอัตราการไหลสูงทำให้แรงเฉือนของ In-Line Static Mixer ในท่อสูงขึ้นด้วยจึงช่วยส่งเสริมการทำลายดีเอ็นเอให้สั้นลงด้วย จะสังเกตได้ว่าที่อัตราการไหล 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ความหนืดที่วัดได้จะมีค่าต่ำกว่าที่อัตราการไหลที่ 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนที่ระยะทาง 90 เซนติเมตร ใช้เวลา 5.56 วินาที ในการสลายเซลล์ด้วยด่างซึ่งเวลาที่นานเกินไปดีเอ็นเอก็จะถูกทำลายมากขึ้นสังเกตได้จากสีที่เกิดขึ้นมีความใสมากกว่าที่ระยะทาง 30 และ 60 เซนติเมตร ความหนืดที่วัดได้จึงมีค่าต่ำกว่าที่ระยะทาง 30 และ 60 เซนติเมตร ตามลำดับและค่า Re มีรูปแบบการไหลของของเหลวภายในท่อ In-Line Static Mixer เป็นแบบ laminar

การทดลองที่อัตราการไหล 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ดังภาพที่ 4-13 (c) ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร มีความหนืดที่ใกล้เคียงกันมากแต่ที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร มีค่าความหนืดสูงกว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร ซึ่งต่างจากการทดลองที่ผ่านมาทั้ง 2 การทดลองที่ว่าระยะทาง 30 เซนติเมตร จะมีค่าความหนืดสูงที่สุด เนื่องจากที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร ของการทดลองที่อัตราไหล 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาการสลายเซลล์เพียงแค่ 0.94 วินาที (ตารางที่ 4.2) จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้การสลายเซลล์ด้วยด่างเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 2 วินาที ทำให้การสลายเซลล์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ดีเอ็นเอของเซลล์จึงถูกทำลายได้น้อยความหนาแน่นของเซลล์จึงสูงกว่าการสลายเซลล์ด้วยด่างที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลา 1.88 วินาที (ตารางที่ 4.2) ดีเอ็นเอจึงถูกทำลายได้สมบูรณ์กว่าทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอที่ถูกทำลายด้วยด่างมีความหนาแน่นมากกว่าความหนืดที่ได้จึงมีค่าสูงกว่าที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร ส่วนที่ระยะทาง 90 เซนติเมตรมีความหนืดต่ำที่สุด เพราะระยะเวลาในการสลายเซลล์ที่นานเกินไปและอัตราการไหลที่สูงทำให้แรงเฉือนของ In-Line Static Mixer ในท่อสูงขึ้นด้วยจึงช่วยส่งเสริมการทำลายโมเลกุลดีเอ็นเอให้มีขนาดสั้นลงความหนืดที่วัดได้จึงมีค่าต่ำที่สุด นอกจากนี้สีผสมที่เกิดขึ้นก็มีความใสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสีที่ระยะทาง 30 และ 60

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

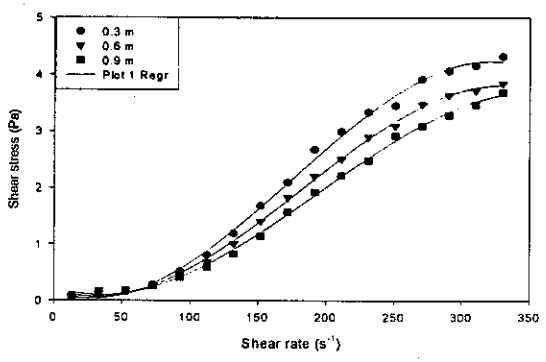
เซนติเมตร ดังภาพที่ 4-11 และค่า Re มีรูปแบบการไหลของของเหลวภายในท่อ In-Line Static Mixer เป็นแบบ laminar

จากการทดลองที่ผ่านมาทั้ง 3 การทดลอง กล่าวได้ว่าระยะทางเพิ่มขึ้นหรือเวลาเพิ่มขึ้นและที่อัตราการไหลสูงมีผลให้ความหนืดลดลง เพราะดีเอ็นเอเป็นโพลีเมอร์ดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ เนื่องจากระยะทางยาวเวลาที่ดีเอ็นเอถูกด่างทำลายนานขึ้นและอัตราการไหลที่สูงขึ้นทำให้แรงเฉือนของ In-Line Static Mixer ในท่อสูงขึ้นด้วยมีผลทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลงความหนืดจึงลดลง นอกจากนี้สีผสมที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับความหนืด คือสีผสมเข้มความหนืดสูงสีผสมจางความหนืดต่ำ

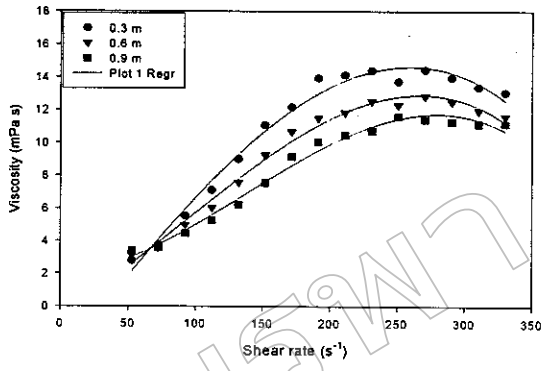
ตารางที่ 4-4 ค่า Re ที่อัตราการไหลของ lysate ที่ระยะทางต่าง ๆ กัน (ภาคผนวก ฌ )

| อัตราการไหลของสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายด่างแก่ (มิลลิลิตรต่อนาที) | อัตราการไหลของ lysate (มิลลิลิตรต่อนาที) | ความเร็ว (เมตรต่อนาที) | ความหนืด (มิลลิปาสคาลวินาที) ที่ระยะทางต่าง ๆ (เมตร) | | | ค่า Re ที่ระยะทางต่าง ๆ (เมตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 0.3 | 0.6 | 0.9 |
| 125: 250 | 375 | 0.08 | 14.50 | 13.00 | 11.80 | 55.49 | 63.85 | 70.34 |
| 250: 500 | 750 | 0.16 | 11.20 | 10.80 | 9.00 | 143.68 | 153.70 | 184.44 |
| 500: 1,000 | 1,500 | 0.32 | 6.50 | 8.00 | 7.00 | 495.13 | 415.00 | 474.28 |

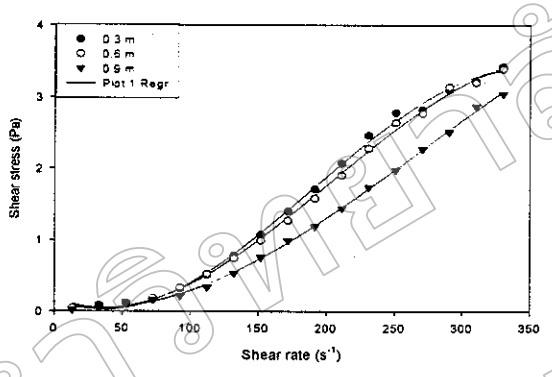
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



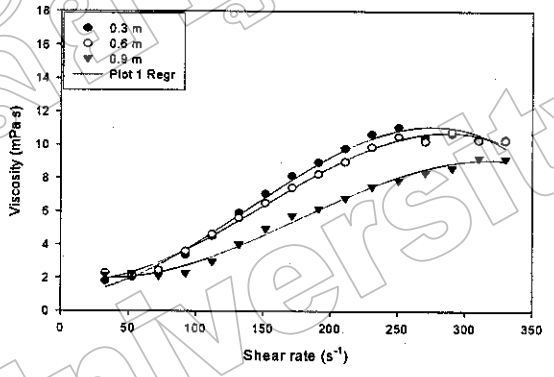

(a)



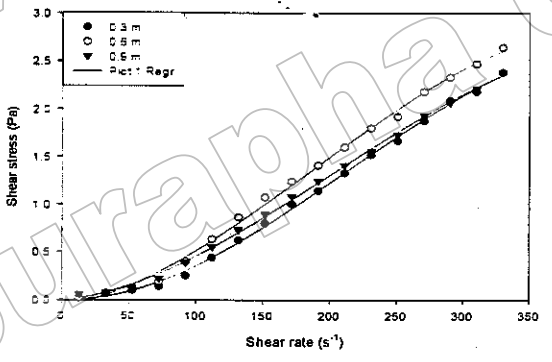

(a)



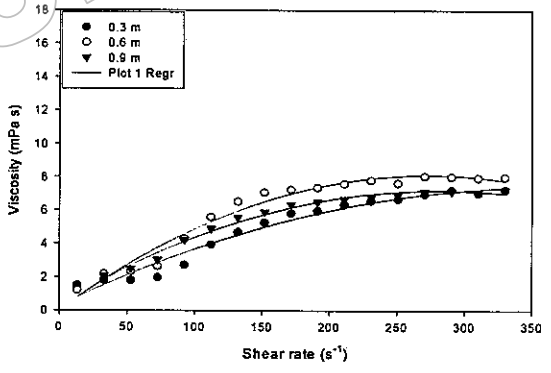

(b)




(b)




(c)




(c)

**ภาพที่ 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

**ภาพที่ 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความหนืดและลักษณะของการไหลของ neutralised suspension ขณะทำให้ lysate เป็นกลางแสดงไว้ในภาพที่ 4-14 ถึง 4-15 และ ตารางที่ 4-5 ค่า Re ที่อัตราการไหลของ neutralised suspension ที่ 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร โดยนำค่าความหนืดที่วัดได้ไปคำนวนหาค่า Re ดูลักษณะการไหลของสารผสมมีลักษณะการไหลแบบใด พบว่าที่อัตราการไหลของ lysate 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร มีลักษณะการไหลแบบ laminar ส่วนที่อัตราการไหลของ lysate 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร มีลักษณะการไหลแบบ trasition

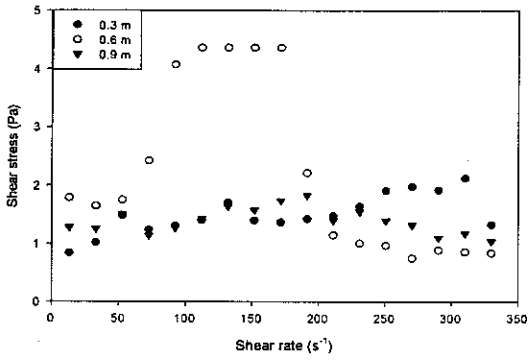
จากการศึกษาความหนืดของการทำให้ lysate เป็นกลางที่อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ดังภาพที่ 4-14 และ 4-15 (a, b และ c) พบว่าที่อัตราการไหล 375: 125 และ 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าความเครียดเฉือนจะขึ้น ๆ ลง ๆ เพราะในการวัดความหนืดจะต้องไม่มีของแข็งเจือปนสารผสมต้องเป็นเนื้อเดียวกันแต่ neutralised suspension ที่ได้จากการทำให้ lysate เป็นกลางจะมีของแข็งพวกเศษเซลล์แขวนลอยอยู่ในของเหลวสังเกตเห็นจากภาพที่ 4-16 ซึ่งเศษเซลล์ที่อัตราการไหล 375: 125 และ 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที มีขนาดใหญ่แขวนลอยอยู่ในของเหลวเมื่อนำไปวัดความหนืดค่าที่ได้มาจึงไม่คงที่แต่เมื่อเพิ่มอัตราแรงเฉือนไปถึงจุดจุดหนึ่งความหนืดเริ่มจะคงที่เพราะ lysate เริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามอัตราเฉือน และค่า Re ที่อัตราการไหล 375: 125 และ 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที มีรูปแบบการไหลของของเหลวภายในท่อ In-Line Static Mixer เป็นแบบ laminar ส่วนที่อัตราการไหล 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที เศษเซลล์มีขนาดเล็กแขวนลอยอยู่ในของเหลวเมื่ออัตราแรงเฉือนเพิ่มขึ้นค่าความหนืดของ neutralised suspension จะลดลงและมีลักษณะการไหลเป็นเส้นตรงซึ่งจะแสดงการไหลแบบ Newtonain หรือที่เรียกว่าการไหลของของเหลวในอุดมคติ ซึ่งจากการทดลองของ Ciccolini et al. (1998) และ Chamsart (2001) พบว่าการทำให้เป็นกลาง lysate จะเริ่มแขวนลอยด้วยการตกตะกอนเศษเซลล์และความหนืดต่ำมากประมาณ 2-3 มิลลิปาสคาลวินาที ซึ่งสัมพันธ์กับการทดลองที่อัตราการไหล 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที จากกราฟแสดงค่าความหนืดที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร มีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 2-3 มิลลิปาสคาลวินาที และค่า Re มีรูปแบบการไหลของของเหลวภายในท่อ In-Line Static Mixer เป็นแบบ transition

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

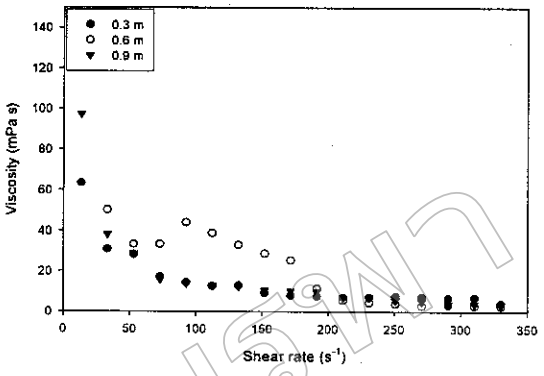
ตารางที่ 4-5 ค่า Re ที่อัตราการไหล neutralised suspension ระยะทางต่าง ๆ กัน (ภาคผนวก ฌ)

| อัตราการไหลของ lysate: สารทำให้เป็นกลาง (มิลลิลิตรต่อนาที) | อัตราการไหลของ neutralised suspension (มิลลิลิตรต่อนาที) | ความเร็ว (เมตรต่อนาที) | ความหนืด (มิลลิปาสคาลวินาที) ที่ระยะทางต่าง ๆ (เมตร) | | | ค่า Re ที่ระยะทางต่าง ๆ (เมตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 0.3 | 0.6 | 0.9 |
| 375: 125 | 500 | 0.11 | 3.50 | 3.00 | 2.50 | 368.89 | 442.66 | 553.33 |
| 750: 250 | 1,000 | 0.21 | 2.50 | 2.00 | 2.00 | 885.33 | 1,106.66 | 1,106.66 |
| 1,500: 500 | 2,000 | 0.42 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2,213.32 | 2,213.32 | 2,213.32 |

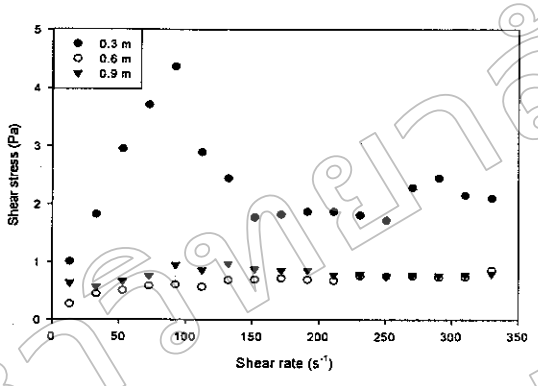
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



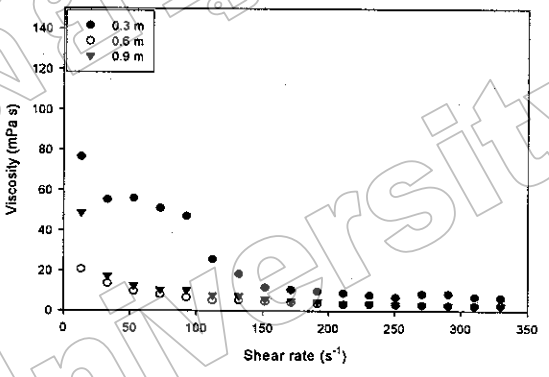

(a)



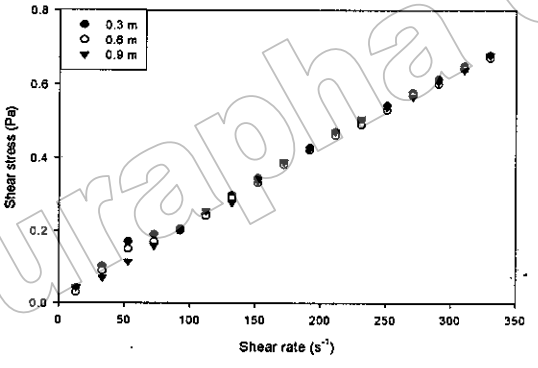

(a)



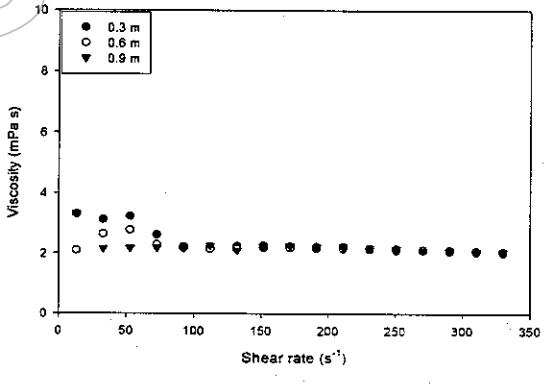

(b)




(b)




(c)




(c)

**ภาพที่ 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

**ภาพที่ 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**ลักษณะของเศษเซลล์ที่เกิดจากการทำให้ lysate เป็นกลาง**

จากภาพที่ 4-16 (ก), (ข) และ (ค) แสดงขนาดของเศษเซลล์ที่เกิดจากการทำให้ lysate เป็นกลางและความหนาแน่นของตัวอย่างที่อัตราไหลที่ 375: 125, 750: 250 และ 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งขึ้นกับระยะทางของขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางระยะทางมีส่วนสำคัญต่อความหนาแน่นของเศษเซลล์มากกว่าอัตราการไหลสังเกตได้จากขนาดของเศษเซลล์มีขนาดเล็กลงเมื่อความยาวของท่อเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่อัตราการไหลที่สูงดังภาพที่ 4-16 (ข) และ (ค) เศษเซลล์จะมีความหนาแน่นน้อยกว่า 1,045 กิโลกรัมต่อตารางเมตร (ต่ำกว่าความหนาแน่นของสารทำให้เป็นกลางของ 3 M โพแทสเซียมอะซีเตท) ดูจากระยะทาง 30 เซนติเมตร ที่อัตราการไหลทั้งสามทำนองเดียวกันความหนาแน่นที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร ที่อัตราการไหล 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที เกิดจากที่ระยะเวลาต่ำกว่าส่วนเศษเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง (มากกว่า 1,045 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร) ได้จากระยะทาง 90 เซนติเมตร และเศษเซลล์ที่มีความหนาแน่นปานกลางได้จากระยะทาง 60 เซนติเมตร

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

ก. เศษเซลล์ที่อัตราการไหลของ neutralised suspension 375: 125 มิลลิลิตรต่อนาที

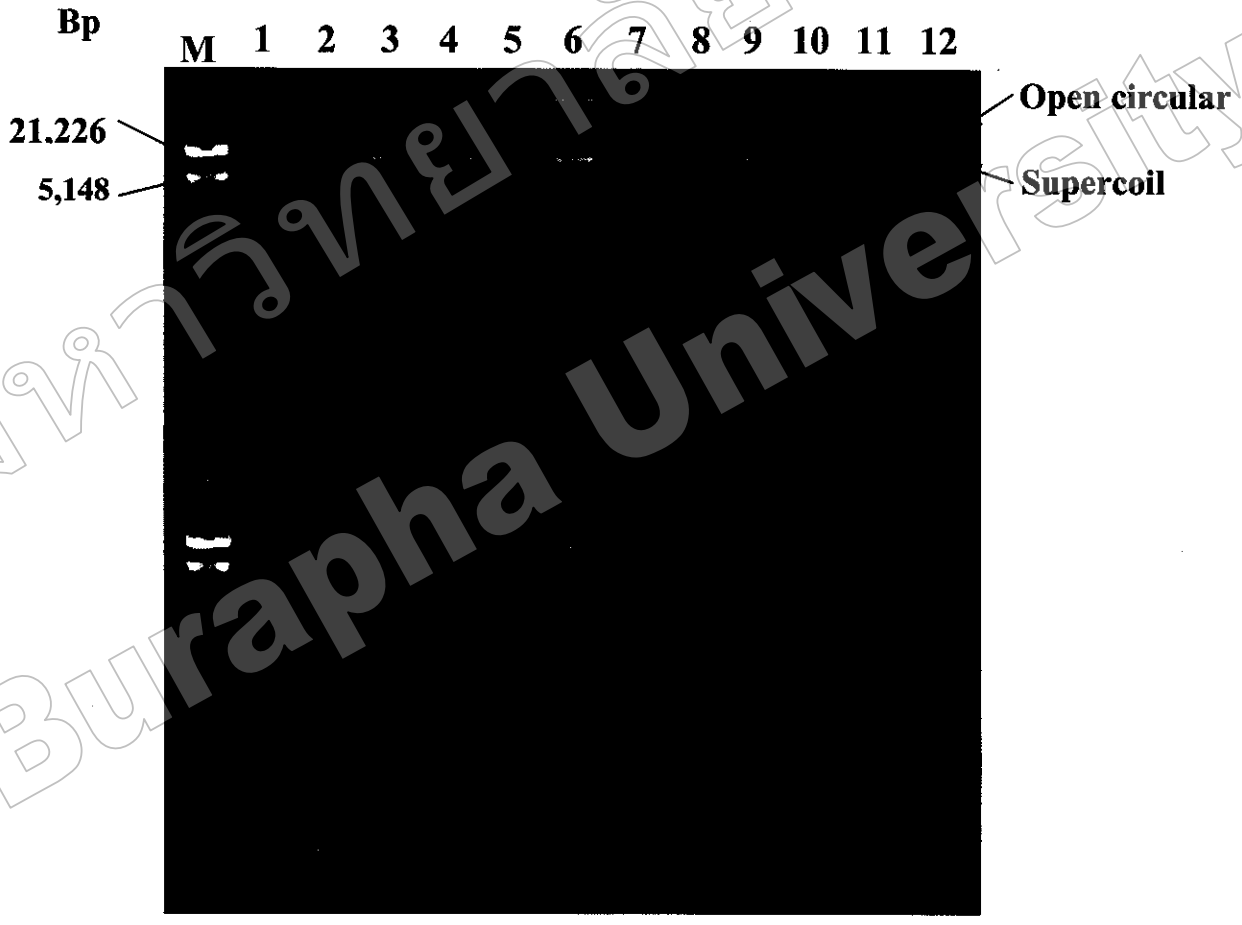
ข. เศษเซลล์ที่อัตราการไหลของ neutralised suspension 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที

ค. เศษเซลล์ที่อัตราการไหลของ neutralised suspension 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**2. การตรวจสอบคุณภาพพลาสมิดด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส**
(gel electrophoresis)

จากการทดลองนำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอน การสลายเซลล์และการทำให้ lysate เป็นกลางมาทำการรันบนเจลเพื่อดูคุณภาพของพลาสมิดที่ได้จากตัวอย่างว่ามีพลาสมิดที่ต้องการหรือไม่ดังภาพที่ 4-17 และ 4-18 ผลจากการทำอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าวิธีการสกัดพลาสมิดแบบต่อเนื่องโดยการใช้ In-Line Static Mixer สามารถทำให้ได้พลาสมิดที่ต้องการโดยเฉพาะมีปริมาณ สัดส่วนของ supercoil พลาสมิดที่ต้องการมากที่สุดและปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มากกว่าวิธีการสกัดภายในหลอดทดลอง




ภาพที่ 4-17 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้เปรียบเทียบกับ marker λDNA/*Eco*RI + HindIII

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เลนที่ 1 ตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์พ (ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

เลนที่ 2, 3 และ 4 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 5, 6 และ 7 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 8 ตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์พ

เลนที่ 9, 10 และ 11 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 12, 13 และ 14 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 15 ตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง หลอดแอบเพนดอร์พ

เลนที่ 16, 17 และ 18 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 19, 20 และ 21 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 4-18 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer เปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I

เลนที่ 1 ตัวอย่างพลาสมิดการสลายเซลล์ภายในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์ฟ (ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

เลนที่ 2, 3 และ 4 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 125: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 5, 6 และ 7 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 375: 125 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

เลนที่ 8 ตัวอย่างพลาสมิดการสลายเซลล์ภายในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์ฟ

เลนที่ 9, 10 และ 11 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม.ตามลำดับ

เลนที่ 12, 13 และ 14 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เลนที่ 15 ตัวอย่างพลาสมิดการสลายเซลล์ภายในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์พ

เลนที่ 16, 17 และ 18 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ 500: 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

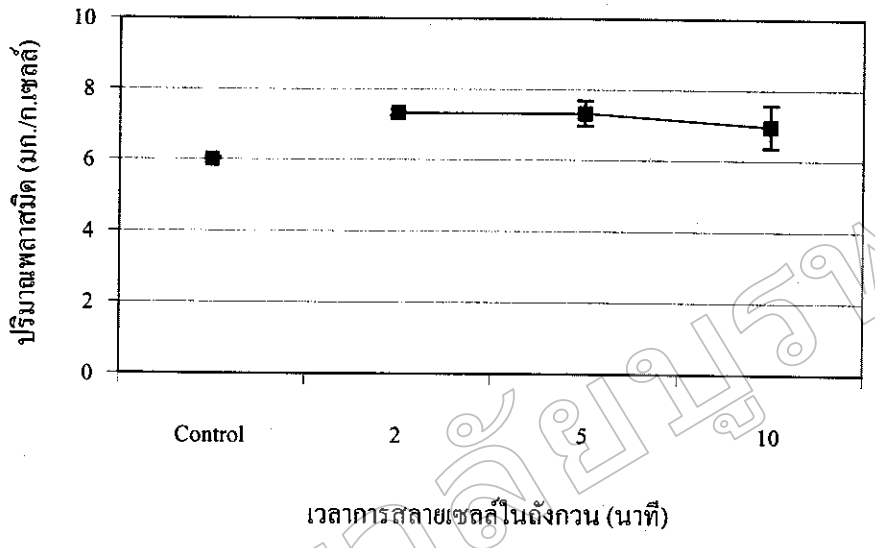
เลนที่ 19, 20 และ 21 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 1,500: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 ซม. ตามลำดับ

**การสลายเซลล์ผ่าน In-line Static Mixer แบบต่อเนื่องประกอบกับการใช้ถังกวน**

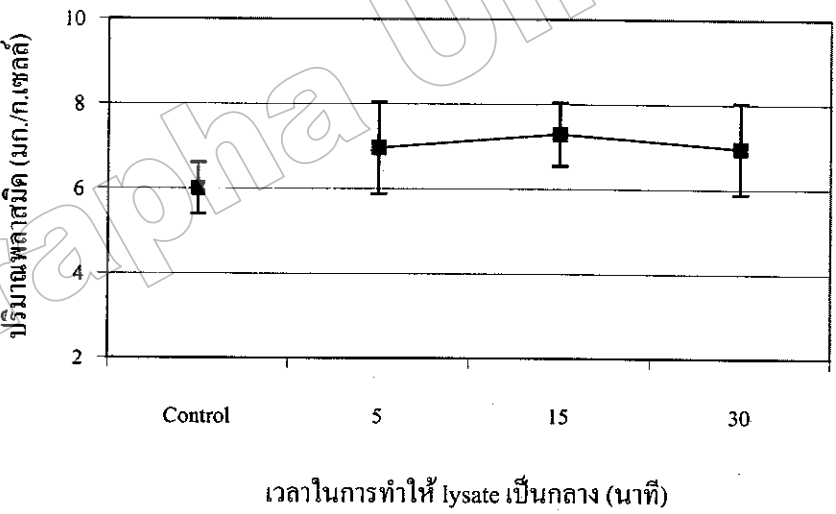
การทดลองนี้ทำการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixers เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผสมระหว่างเซลล์แขวนลอยกับสารละลายด่างในการทำงานของถังกวนโดยการไหลเซลล์แขวนลอยเซลล์ (ความเข้มข้น 120 กรัม/ลิตร ของสารแขวนลอยเซลล์): สารละลายด่างแก่ที่มีสัดส่วนอัตราการไหล 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่าน In-Line Static Mixer เป็นระยะทาง 60 เซนติเมตร แล้วให้ lysate ไหลไปรวมกันในถังกวนขนาดความจุ 10 ลิตร ที่อัตราเร็วใบพัด Ekato Intermig 2 ใบ 200 รอบต่อนาที แล้วกวนต่อไปเป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างของ lysate จากถังกวนที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นเมื่อครบเวลา 10 นาที เริ่มทำการไหลสารที่ทำให้เป็นกลางลงไปภายในถังกวนด้วยอัตราการไหล 250 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการกวนด้วยใบพัดต่อไปอีก 30 นาที ทำการเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ เก็บตัวอย่างแต่ละระยะเวลา ๆ ละ 2 ตัวอย่าง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ ปรากฏว่าการสลายเซลล์ที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ของการกวนภายในถังให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.33, 7.33 และ 6.97 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-19) และการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 6.96, 7.29 และ 6.96 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-20) เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ 6.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ในการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ก่อนลงถังหมักและทำให้เป็นกลางแบบต่อเนื่องในถังกวนมีปริมาณที่มากกว่า เพราะในทางปฏิบัติไม่จำเป็นที่จะต้องทำการสลายเซลล์โดยใช้ทั้งสองวิธีคือทั้งการสลายเซลล์ในท่อและในถังกวน เพราะการสลายเซลล์ในท่อเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอแล้วสามารถทำให้ได้ปริมาณพลาสมิดสูงสุดแล้ว จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 3 ระยะทางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-19 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

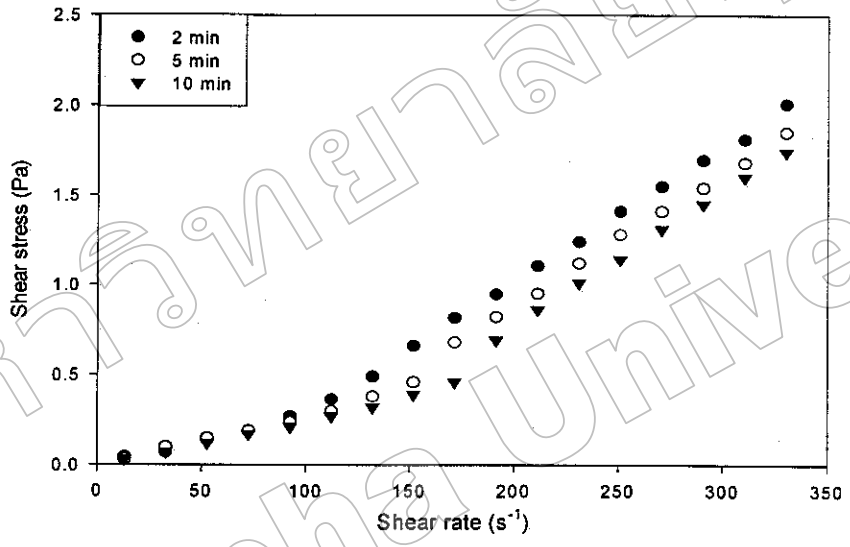



ภาพที่ 4-20 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

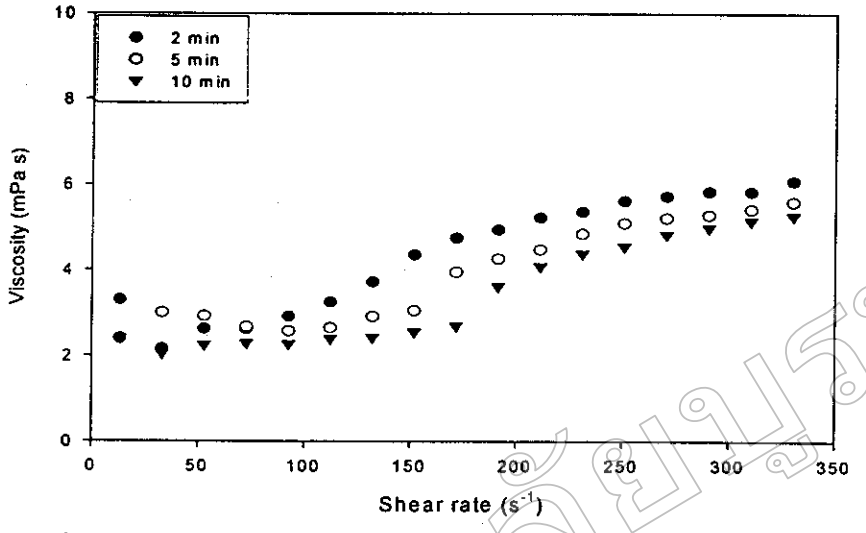
**1. ความหนืดการสลายเซลล์ผ่าน In – Line Static Mixer แบบต่อเนื่องประกอบกับการใช้ถังกวน**

ภาพที่ 4-21 และ 4-22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดเฉือนและความหนืดกับอัตราแรงเฉือนของตัวอย่าง lysate ในถังกวนในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่าง ที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที จากการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลา 2 นาที ความหนืดที่วัดได้จะมากกว่าระยะเวลา 5 และ 10 นาที เพราะระยะเวลามากขึ้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือเสียสภาพ เนื่องจากถูกแรงเฉือนของใบพัดและด่างทำลายนานขึ้นทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลงความหนาแน่นของเซลล์ลดลง ดังนั้นความหนืดจึงลดลงดังแสดงในภาพที่ 4-22




ภาพที่ 4-21 Shear stress กับ shear rate ของ lysate ที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

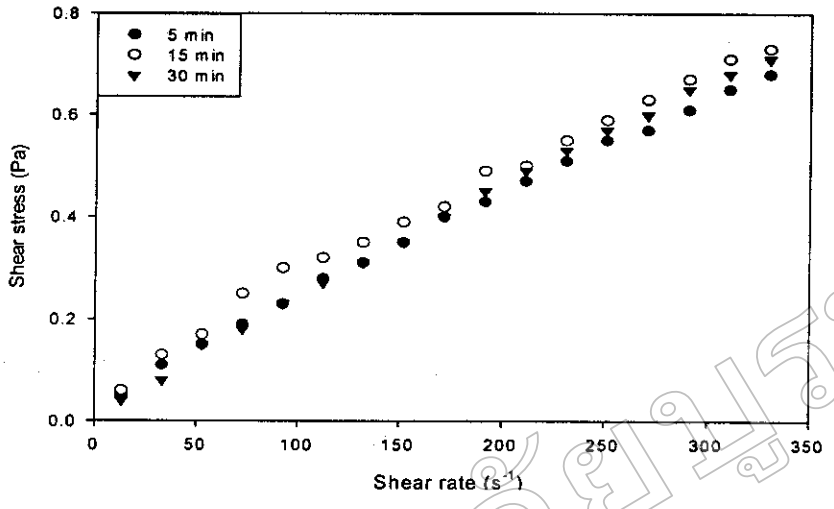
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



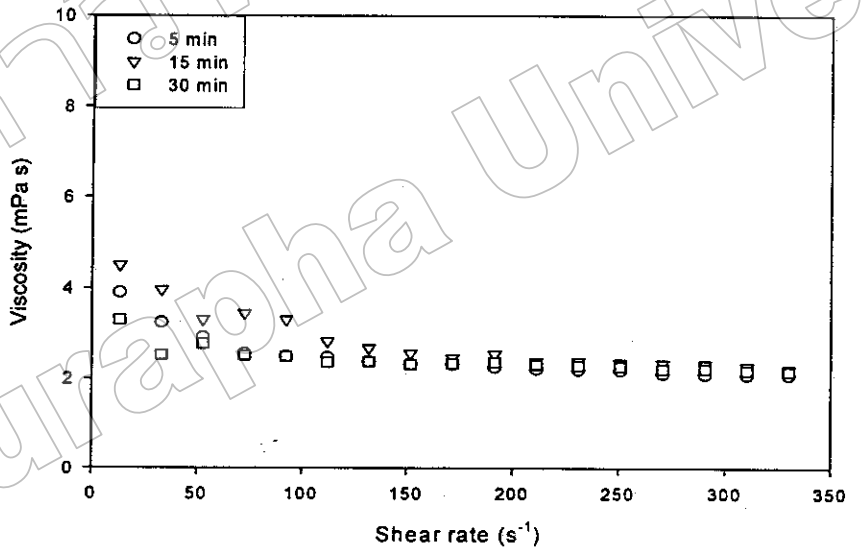

ภาพที่ 4-22 ความหนืดของ lysate ที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลาง (ภาพที่ 4-23 และ 4-24) จากการศึกษาพบว่าตัวอย่าง neutrlised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ความหนืดทั้ง 3 ระยะเวลานี้จะใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วงประมาณ 2-3 เท่าของความหนืดของน้ำและเริ่มจะเป็นเส้นตรงในระดับเดียวกันแสดงให้เห็นว่าความหนืดที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของของเหลวในอุดมคติ (Newtonain fluid) คือที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ ที่ของไหลมีค่าความหนืดเป็นค่าคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามอัตราแรงเฉือนหรือความเร็วในการกวนของใบพัด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-23 Shear stress กับ shear rate ของ neutralised suspension ที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลาต่าง ๆ




ภาพที่ 4-24 ความหนืดของ neutralised suspension ที่ได้จากการสลายเซลล์ ผ่าน In-Line Static Mixer ร่วมกับการใช้ถังกวนในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลาต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**2. การตรวจสอบคุณภาพพลาสมิดด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)**

จากการทดลองนำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอนการสลายเซลล์และการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวนมาทำการรันบนเจลเพื่อดูคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอว่ามีพลาสมิดที่ต้องการหรือไม่ดังภาพที่ 4-25 ผลจากการทำอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนมากกว่าวิธีการสกัดภายในหลอดทดลอง

ภาพที่ 4-25 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนเปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I

เลนที่ 1 และ 2 ตัวอย่างพลาสมิดการสลายเซลล์ภายในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์ฟ (ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

เลนที่ 3 และ 4 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวนเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ ที่ระยะเวลา 2 นาที

เลนที่ 5 และ 6 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวนเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ ที่ระยะเวลา 5 นาที

เลนที่ 7 และ 8 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหกวนเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ ที่ระยะเวลา 10 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เลนที่ 9 และ 10 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวน lysate: สารทำให้เป็นกลาง ที่ระยะเวลา 5 นาที

เลนที่ 11 และ 12 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวน lysate: สารทำให้เป็นกลาง ที่ระยะเวลา 15 นาที

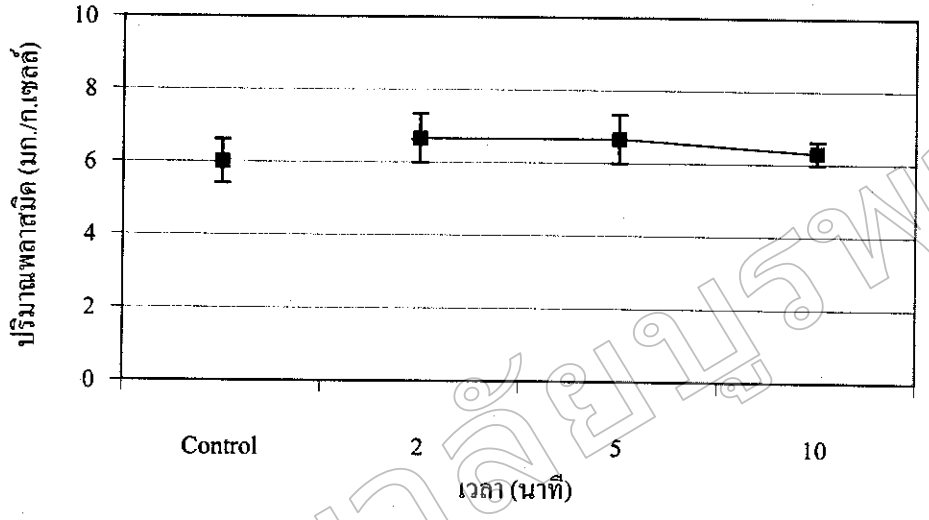
เลนที่ 13 และ 14 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวน lysate: สารทำให้เป็นกลาง ที่ระยะเวลา 30 นาที

**การสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน**

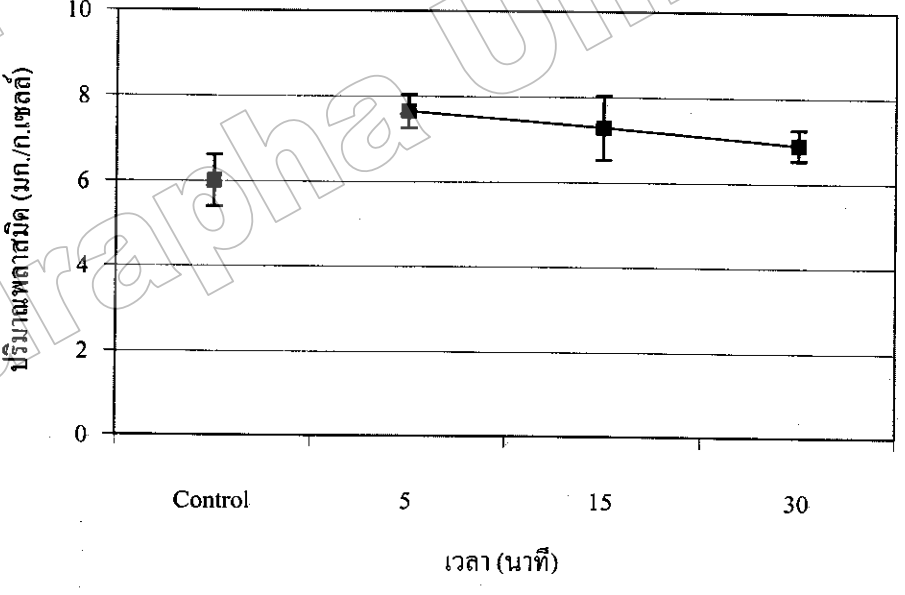
การทดลองนี้เพื่อเปรียบเทียบกับการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer ว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer กับปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนวิธีใดให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สูงกว่า ทำโดยการไหลเซลล์แขวนลอย (ความเข้มข้น 120 กรัม/ลิตร ของสารแขวนลอยเซลล์) ปริมาตร 1 ลิตรลงในกวนที่อัตราเร็วใบพัด 200 รอบต่อนาที จากนั้นไหลสารละลายด่างลงไปในถังเดียวกันที่อัตราการไหล 2 ลิตรต่อนาที ปล่อยให้สารทั้งสองกวนผสมกันเป็นเวลารวม 10 นาที ขณะเดียวกันเก็บตัวอย่างของ lysate ที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ เมื่อกวนผสม lysate ในถังกวนเป็นเวลา 10 นาทีแล้ว เริ่มทำการไหลสารที่ทำให้ lysate เป็นกลางลงไปภายในถังหมักด้วยอัตราการไหล 1 ลิตรต่อนาที ทำการกวนผสมเป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ เก็บตัวอย่างแต่ละระยะเวลา ๆ ละ 2 ตัวอย่าง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอปรากฏว่า การสลายเซลล์ในถังกวนที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 6.66, 6.66 และ 6.30 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-26) และการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.65, 7.29 และ 6.90 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-27) เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ 6.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ในการสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลางแบบต่อเนื่องในถังกวนมีปริมาณที่มากกว่า เพราะในทางปฏิบัติไม่จำเป็นที่จะต้องทำการสลายเซลล์โดยใช้ทั้งสองวิธีคือทั้งการสลายเซลล์ในท่อและในถังกวน เพราะการสลายเซลล์ในท่อเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอแล้วสามารถทำให้ได้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอสูงสุดแล้ว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-26 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ในถังกวนที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

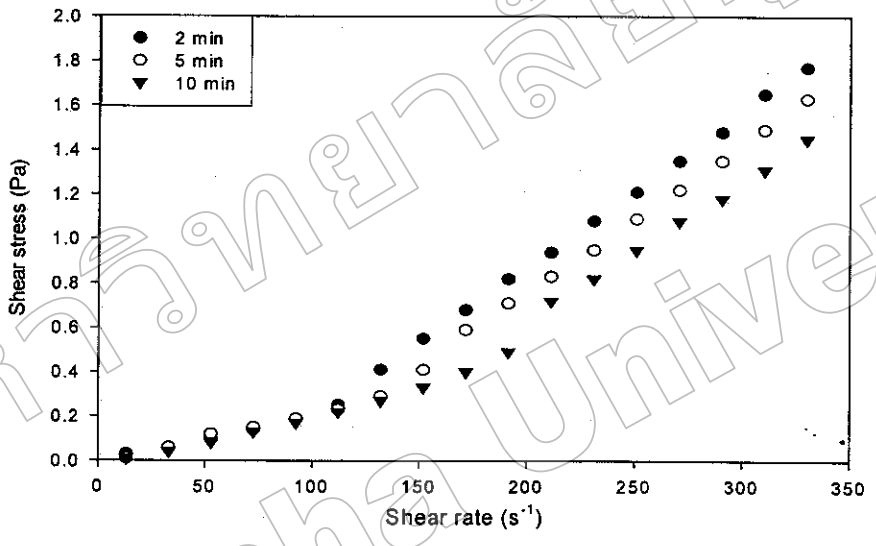



ภาพที่ 4-27 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนในขั้นตอนของการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

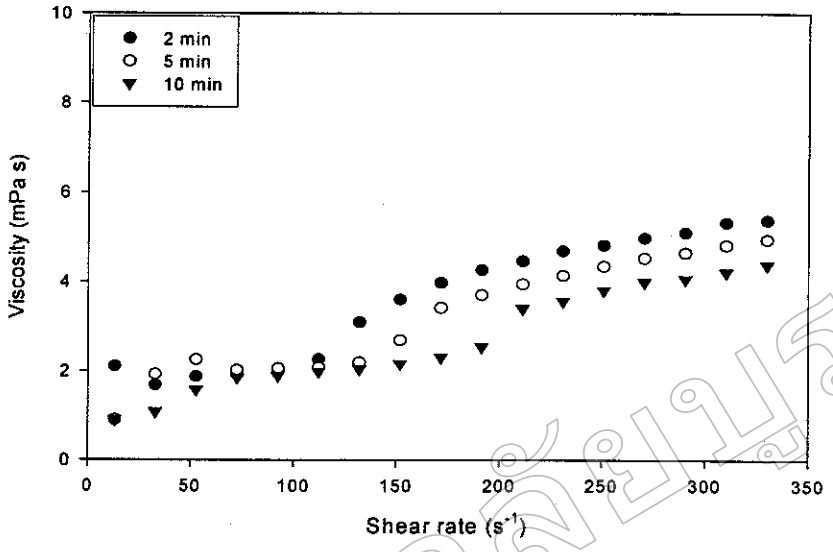
**1. ความหนืดของการสลายเซลล์แบบต่อเนื่องในถังกวน**

ภาพที่ 4-28 และ 4-29 ความเครียดเฉือนและความหนืดของตัวอย่างในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างในถังกวนที่อัตราการกวน 200 รอบต่อวินาที ที่ระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที พบว่าค่าความหนืดที่ระยะเวลา 2 นาทีจะมีค่าสูงกว่าค่าความหนืดที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที ตามลำดับ เพราะระยะเวลามากขึ้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้เป็นโมเลกุลสั้นลง ๆ หรือเสียสภาพ เนื่องจากถูกแรงเฉือนของใบพัดและด่างทำลายนานขึ้นทำให้สายดีเอ็นเอสั้นลงความหนาแน่นของเซลล์ลดลง ดังนั้นความหนืดจึงลดลงดังแสดงในภาพที่ 4-29




ภาพที่ 4-28 Shear stress กับ shear rate ของ lysate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ในถังกวน

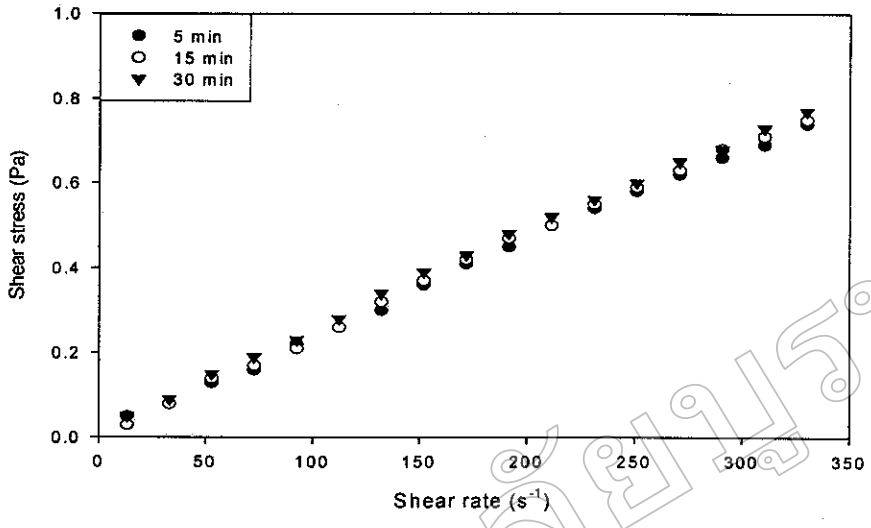
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



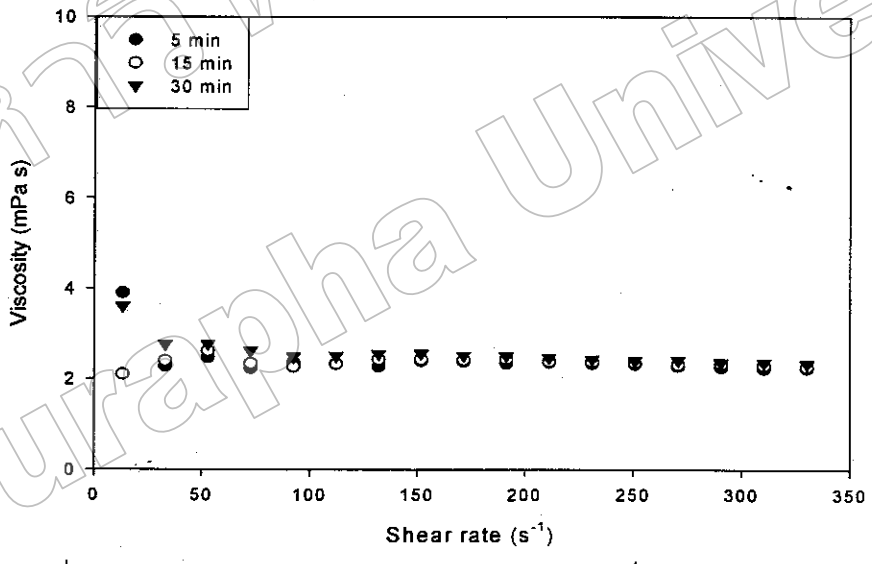

ภาพที่ 4-29 ความหนืดของ lysate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการสลายเซลล์ด้วยด่างแก่ในถังกวน

ในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลาง (ภาพที่ 4-30 และ 4-31) จากการศึกษาพบว่า ตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที ความเครียดเฉือนและความหนืดทั้ง 3 ระยะเวลานี้จะใกล้เคียงกันความหนืดจะอยู่ในช่วงประมาณ 2-3 เท่าของความหนืดของน้ำและเริ่มจะเป็นเส้นตรงในระดับเดียวกันแสดงให้เห็นว่าความหนืดที่ระยะเวลา 5, 15 และ 30 นาที มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรงซึ่งเป็นคุณสมบัติของของเหลวในอุดมคติ คือที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ ที่ของไหลมีค่าความหนืดเป็นค่าคงที่ ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามอัตราแรงเฉือนหรือความเร็วในการกวนของใบพัด ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทำให้ lysate เป็นกลางภายในท่อและในถังกวนจากการทดลองที่ผ่านมาแล้วตอนต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-30 Shear stress กับ shear rate ของ neutralised suspension ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน




ภาพที่ 4-31 ความหนืดของ neutralised suspension ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวน

จากการศึกษาความหนืดของการสลายเซลล์ในถังกวนผ่าน In-Line Static Mixer และการสลายเซลล์ในถังกวนโดยไม่ผ่าน In-Line Static Mixer ไม่แตกต่างกันทั้งขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยด่างและการทำให้ lysate เป็นกลาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**2. การตรวจสอบคุณภาพพลาสมิดด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)**

จากการทดลองนำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอนการสลายเซลล์และการทำให้ lysate เป็นกลางในถังกวนมาทำการรันบนเจลเพื่อดูคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอว่ามีพลาสมิดที่ต้องการหรือไม่ดังภาพที่ 4-32 ผลจากการทำอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนมากกว่าวิธีการสกัดภายในหลอดทดลอง

ภาพที่ 4-32 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้จากการสลายเซลล์ในถังกวนเปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I

เลนที่ 1 และ 2 ตัวอย่างพลาสมิดการสลายเซลล์ภายในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์ฟ

เลนที่ 3 และ 4 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวนเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ ที่ระยะเวลา 2 นาที

เลนที่ 5 และ 6 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวนเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ ที่ระยะเวลา 5 นาที

เลนที่ 7 และ 8 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการไหลกวนเซลล์แขวนลอย: สารละลายด่างแก่ ที่ระยะเวลา 10 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

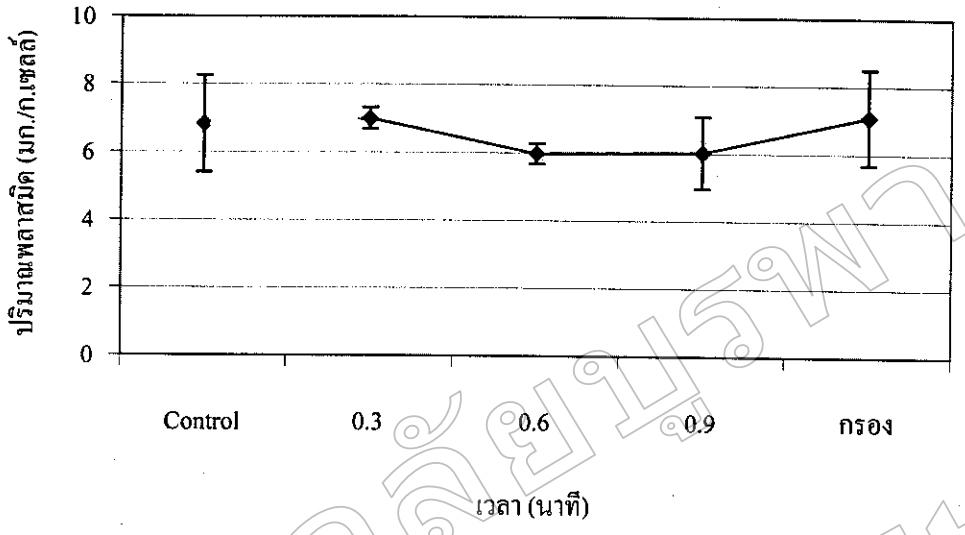
เลนที่ 9 และ 10 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวน lysate: สารทำให้เป็นกลาง ที่ระยะเวลา 5 นาที

เลนที่ 11 และ 12 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวน lysate: สารทำให้เป็นกลาง ที่ระยะเวลา 15 นาที

เลนที่ 13 และ 14 ตัวอย่างการสลายเซลล์ที่อัตราการกวน lysate: สารทำให้เป็นกลาง ที่ระยะเวลา 30 นาที

## การสลายเซลล์แบบต่อเนื่องผ่าน In - Line Static Mixer ตามด้วยการกรองอย่างต่อเนื่อง

การทดลองนี้เป็นการสลายเซลล์ การทำให้ lysate เป็นกลางและการกรองอย่างต่อเนื่อง โดยการไหลเซลล์แขวนลอย (ความเข้มข้น 120 กรัม/ลิตร ของสารแขวนลอยเซลล์) และสารละลายด่าง ที่อัตราการไหล 250: 500 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่าน In-Line Static Mixer เป็นระยะทาง 90 เซนติเมตร ต่อจากนั้นเริ่มทำการไหลสารทำให้ lysate เป็นกลางที่ผสม diatomaceous earth 30 % น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อัตราการไหล 250 มิลลิลิตรต่อนาที เข้าไปผสมกับ lysate ภายใน In-Line Static Mixer ซึ่ง diatomaceous earth ที่ผสมลงไปนี้จะช่วยให้การกรองมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการกรองพวกเศษเซลล์ที่ไม่ต้องการทำให้พลาสมิดที่ต้องการมีการเจือปนน้อยลงทำให้ได้ปริมาณพลาสมิดที่บริสุทธิ์มากขึ้นระยะทางในการทำให้ lysate เป็นกลาง 90 เซนติเมตร ต่อจากนี้จะเป็นระบบการกรองซึ่งต่อจากปลายท่อแก้วท่อนสุดท้ายของกระบวนการทำให้ lysate เป็นกลาง (ดูภาพที่ 4-1) โดยที่ neutralised suspension ที่ผ่านกระบวนการทำให้ lysate เป็นกลางจะผ่านเครื่องกรองอย่างต่อเนื่องทำการเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร และตัวอย่างที่ได้จากการผ่านเครื่องกรองไปวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งพบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการกรองเฉลี่ย 7.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ มีปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้ lysate เป็นกลางที่ระยะทาง 30, 60 และ 90 เซนติเมตร ให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.00, 5.98 และ 6.03 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ (ภาพที่ 4-33)



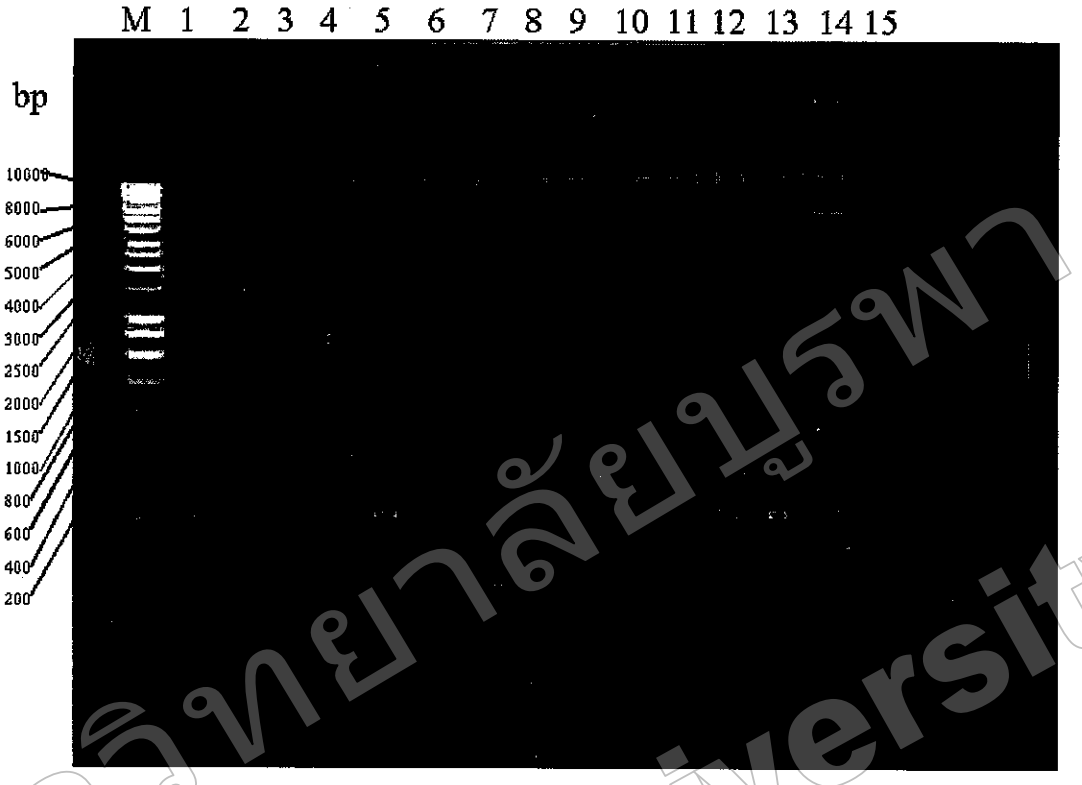

ภาพที่ 4-33 ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากการสลายเซลล์ใน In-Line Static Mixer แบบต่อเนื่องในขั้นตอนของการทำให้เป็นกลางที่ระยะทางต่าง ๆ และที่ผ่านการกรอง (ชุดควบคุม = ทำการสลายเซลล์ในหลอดทดลอง)

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าการสลายเซลล์ การทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In – Line Static Mixer และการกรองอย่างต่อเนื่องให้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สูงกว่าการสลายเซลล์ผ่าน In – Line Static Mixer ที่ไม่ผ่านการกรองซึ่ง diatomaceous earth ที่เติมลงไปในสารทำให้ lysate เป็นกลางนี้จะช่วยกรองเศษเซลล์ที่ไม่ต้องการเพื่อลดการปนเปื้อนทำให้พลาสมิดมีความบริสุทธิ์มากขึ้นปริมาณพลาสมิดที่ได้จึงมีปริมาณที่สูงกว่าไม่ผ่านการกรอง วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่องทั้ง 3 ขั้นตอน คือการสลายเซลล์ด้วยด่าง การทำให้ lysate เป็นกลาง และการกรอง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

1. **การตรวจสอบคุณภาพพลาสมิดด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)**

จากการทดลองนำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอนการสลายเซลล์ การทำให้ lysate เป็นกลางและการกรองภายใน In – Line Static Mixer มาทำการรันบนเจลเพื่อดูคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอว่ามีพลาสมิดที่ต้องการหรือไม่ดังภาพที่ 4-34 ผลจากการทำอิเลคโตรโฟรีซิสพบว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In – Line Static Mixer และการกรองมากกว่าปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ผ่านการกรอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 4-34 เจล อิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บได้จากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line Static Mixer และการกรองเปรียบเทียบกับ marker Hyper Ladder I

เลนที่ 1, 2 และ 3 ตัวอย่างพลาสมิดการสลายเซลล์ภายในหลอดทดลองหลอดแอบเพนดอร์ฟ

เลนที่ 4, 5และ 6 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 30 ซม.

เลนที่ 7, 8และ 9 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 60 ซม

เลนที่ 10, 11และ 12 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ระยะทาง 90 ซม

เลนที่ 13, 14และ 15 ตัวอย่างการทำให้เป็นกลางที่อัตราการไหล lysate: สารทำให้เป็นกลาง 750: 250 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ผ่านการกรอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University