

ภาคผนวก ก

1. สารเคมีสำหรับการสลายเซลล์

1.1 การเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ (pH 8.0)

1.1.1 เตรียม TE buffer โดยชั่ง 50 mM Tris-HCl 6.06 กรัม ผสมกับ 10 mM EDTA 3.72 กรัม

1.1.2 ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

1.1.3 ปรับ pH ให้ได้ 8.00 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.1.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมสารละลายต่าง

ซิงโครเนียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม (0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์) ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ SDS 10 กรัม (1% SDS) ที่ละลายแล้วในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียมสารละลายที่เป็นกลาง (pH 5.5)

1.3.1 ซิงโครเนียมอะซิเตต 294.5 กรัม (3 M โพแทสเซียมอะซิเตต) ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

1.3.2 ปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วย glacial acetic acid

1.3.3 ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

1. สารเคมีใช้ทำเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

1.1 20X TBE buffer

89 mM Tris-base 215.6 กรัม

89 mM boric acid 110 กรัม

2 mM EDTA 11.6 กรัม

ผสมให้เข้ากันนำไปหนึ่งชั่วโมงในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 6X gel loading buffer

bromophenol blue (MW.533.60) 0.25 กรัม

xylene cyanol (MW.342.30) 0.25 กรัม

ซูโครส (sucrose) ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 40 กรัม

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 ethidium bromide (EB) stock solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)

ชั่ง ethidium bromide 250 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer จนกว่าจะละลายเก็บไว้ในขวดที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 1% agarose gel

การเตรียมอะกาโรสเจลเติมผงอะกาโรสลงบนบัฟเฟอร์นำไปต้มจนเดือดตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทลงในเจลแอมเบอร์

ภาคผนวก ค

1. อาหารเพาะเชื้อ (LB broth)

tryptone	10	กรัมต่อลิตร
yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

↓
ปรับ pH ให้เป็น 7 โดยใช้ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์

↓
ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

↓
จากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

↓
รอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 37 °C นำอาหารเทลงใส่ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ปริมาตรฟลาสก์ละ 350 มิลลิลิตร

↓
นำเชื้อที่เราใช้ในการหมักที่เตรียมไว้ใส่ลงไป

↓
นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อวินาทีเป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (terrific broth)

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแทน LB broth เพื่อเป็นแหล่งอาหารให้เชื้อสามารถผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงประกอบด้วย

pancreatic digest of casein	11.8 กรัม
yeast extract	23.6 กรัม
dipotassium hydrogen phosphate	9.4 กรัม

potassium dihydrogen phosphate 2.2 กรัม

3. อาหารแข็ง PCA (plate count agar)

ชั่ง PCA 23.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

นำไปต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

รอให้เย็นนำอาหารเทลงบน plate ที่เตรียมไว้

ใส่ไว้ในตู้บ่มที่ปราศจากเชื้อที่เปิด UV ไว้

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium)

batch complex medium composition (Varley *et al.*, 1999)

component	quantity required for 1 ลิตร
potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	3 g
disodium hydrogen ortho phosphate (Na_2HPO_4)	6 g
sodium chloride (NaCl)	0.5 g
gibco select peptone 140	18 g
ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	10 g
glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	28 ml
trace element solution	0.5 ml
calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.03 g
ferrous sulphate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.04 g
citric acid	0.02 g
gibco select yeast extract	20 g
deionised water	0.92 L

trace element solution

เตรียมสาร 100 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิลิตรสำหรับ อาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร)

component	quantity required (กรัม)
cobalt chloride hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0.20
copper chloride dihydrate ($\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.19
boric acid (H_3BO_3)	0.16
manganese sulphate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.16
sodium molybdate dihydrate ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.20
zinc chloride heptahydrate ($\text{ZnCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.20
ferric sulphate ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$)	0.10 g
calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.10 g
citric acid	6.00
deionised water	To 100 mL

vitamin solution (V1) (0.5 มิลลิลิตรสำหรับอาหาร 1 ลิตร)

component	quantity required (กรัม)
biotin	0.006
folic acid	0.004
pyridoxine-HCl	0.140
riboflavin	0.042
pantothenic acid	0.540
niacin (nicotinic acid)	0.610
deionised water	To 100 mL

post sterilization addition (PSA)

PSA solution 1 (for 1 L fermentation)

component	quantity required
magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
deionised water	12 mL

PSA solution 2 (for 1 L fermentation)

component	quantity required
BDH glycerol	28 mL

PSA solution 3 (for 1 L fermentation)

component	quantity required
thiamine hydrochloride	0.03 g
vitamin solution (V1)	0.5 mL
tetracycline	0.012 g

การเตรียมอาหารสำหรับการหมักแบบ fed-batch culture เพื่อใช้ในการ feed

component	quantity required
glycerol ($C_3H_8O_3$)	190 mL
casein of soy hydrolysate	13.5 g
select yeast extract	135 g
deionised water	To 1 L

5. ภาวะการเพาะเลี้ยงที่กำหนด

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

อัตราการกวน 200 – 400 รอบต่อนาที

อัตราการให้อากาศ 1 vvm

pH 6.8 – 6.9

ภาคผนวก ง

1. วิธีการดำเนินการทดลอง

1.1 การผลิตเซลล์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

1.1.1 เตรียมถังหมักตามที่คู่มือที่กำหนดไว้ ตรวจสอบระบบให้อากาศปลอดเชื้อ ระบบน้ำเย็นและระบบควบคุมพีเอชด้วยกรดและด่าง (2 N ไฮโดรเจนคลอไรด์ และ 4 N โซเดียมไฮดรอกไซด์)

1.1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ลิตร ตรวจสอบความเรียบร้อยของ probe pH และ dissolved oxygen (DO) ให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ จะต้องเทียบมาตรฐาน (calibrate) ของ probe pH และ dissolved oxygen (DO) ให้ถูกต้องแม่นยำก่อนนำเข้าเสียบกับถังหมัก

1.1.3 หลังจากฆ่าเชื้อและถังหมักเย็นลงแล้วนำต่อเข้ากับระบบของถังหมัก เปิดสวิทช์ให้ระบบน้ำและไฟทำงาน ตรวจสอบการกวน การให้อากาศ อุณหภูมิ และตรวจสอบการทำงานของระบบ pH และ ออกซิเจนละลาย

1.2 การเพาะเลี้ยงในถังหมัก

1.2.1 ถังหมักอยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงานตามที่เตรียมเอาไว้

1.2.2 ถ่ายเชื้อจากกัวเชื้อขวดที่เตรียมไว้ลงในถังหมักและเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง

1.2.3 เก็บตัวอย่างหลังจากการถ่ายเชื้อลงถังหมักทันที และเก็บตัวอย่างทุกๆ

1 ชั่วโมง ครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาสิ่งต่อไปนี้

ความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีการดังต่อไปนี้

ก. วัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ข. หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ค. หาจำนวนเซลล์ทั้งหมด

ง. หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ

1.2.4 ยุติการเพาะเลี้ยงเมื่อการเติบโตอยู่ในระยะคงที่

1.2.5 เก็บน้ำหมักที่เหลือในถังหมักใส่ไว้ในถังที่มีฝาปิดสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 80

องศาเซลเซียสเพื่อที่จะนำไปสกัดหาพลาสมิดดีเอ็นเอล้าง และทำความสะอาดถังหมักโดยการ

ถอดเอา probe ออกมาทำความสะอาดฆ่าเชื้อ นำถังหมักพร้อมน้ำหมักที่เหลือไปทำการฆ่าเชื้อที่

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบอุปกรณ์ควบคุมและถังหมักให้อยู่ในสภาพเรียบร้อย พร้อมทั้งจะใช้งานครั้งต่อไป

1.3 เทคนิคของการหมัก

1.3.1 การเทียบมาตรฐานของ probe pH มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.3.1.1 ก่อนที่จะนำถังหมักไปฆ่าเชื้อ นำ probe pH ต่อเข้ากับเครื่องควบคุม pH เปิดสวิทช์ไฟ

1.3.1.2 ทำความสะอาดตัว probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูตั้งอุณหภูมิของตัวเครื่องไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส

1.3.1.3 แห้ตัว probe ลงในสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 7.0 รอให้ค่าที่อ่านได้คงที่ ปรับปุ่ม zero adjustment ให้อ่านค่า pH เท่ากับ 7.0

1.3.1.4 ล้างตัว probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้งแล้วจุ่มลงในสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.0 รอให้ค่าที่อ่านได้คงที่ ปรับปุ่ม slope adjustment ให้อ่านค่า pH เท่ากับ 4.0

1.3.1.5 เช็ดทำความสะอาดตัว probe ก่อนเสียบเข้าถังหมัก โดยจะต้องให้ตัว probe จุ่มอยู่ในของเหลวเสมอ ปิดสวิทช์ไฟตัวเครื่องควบคุม pH

1.3.1.6 นำถังหมักพร้อมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นแล้วต่อถังหมักเข้ากับอุปกรณ์ควบคุม ตรวจสอบค่า pH ที่อ่านได้จากเครื่องควบคุมเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่อ่านได้ด้วยเครื่อง pH meter หากจำเป็นต้องตั้งปรับค่า pH ใหม่

1.3.1.7 ตั้งให้อุปกรณ์ทำงานควบคุมอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตั้งตัวปั๊มสำหรับการเติมกรด (2N ไฮดรอกไซด์) ดัง (4N โซเดียมไฮดรอกไซด์) และ antifoam (polypropylene glycol) และตรวจสอบการทำงานของระบบควบคุมให้ทำงานปกติ

1.3.2 การเทียบมาตรฐานของ probe ออกซิเจนละลาย มีขั้นตอนดังนี้

ก่อนนำถังหมักไปฆ่าเชื้อตรวจสอบ DO probe ว่าอยู่ในสภาพปกติไม่มี การฉีกขาดของ เมมเบรนหรือการรั่วไหลของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

1.3.2.1 เสียบ DO probe เข้าในตำแหน่งที่ถูกต้องของถังหมัก

1.3.2.2 หลังจากการฆ่าเชื้อและรอให้เย็นลงแล้ว ต่ออุปกรณ์ควบคุมเข้ากับ ถังหมัก ให้ทำงานที่อุณหภูมิ อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศตามที่เรากำหนดไว้

1.3.2.3 เมื่ออุณหภูมิคงที่ตามที่เรากำหนดไว้ และปรับปุ่มให้ DO probe อ่านค่าที่ 100% แสดงว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีการละลายของออกซิเจนอิ่มตัว

1.3.2.4 เปลี่ยนจากการให้อากาศเป็นไนโตรเจนบริสุทธิ์ และปรับปัมให้ DO probe อ่านค่าที่ 0%

2. การเก็บตัวอย่าง

หลังจากเติมเชื้อลงในถังหมักแล้วรอประมาณ 5 นาที เพื่อให้เกิดการผสมผสานกันอย่างทั่วถึง เก็บตัวอย่าง 30 มิลลิลิตร ใช้เป็นตัวอย่างที่ t_0 นำตัวอย่างส่วนหนึ่งวัดค่าความทึบแสงทันที โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น ตัวอย่างอีกส่วนหนึ่ง (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ไปห่าน้ำหนักเซลล์แห้งตัวอย่างอีกส่วน (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) ใช้เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ทั้งหมด และตัวอย่างอีกส่วน (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) ใช้หาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 ความเข้มข้นของเซลล์

3.1.1 ค่าความทึบแสง

นำตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสำคัญมากต่อการวิเคราะห์หาพารามิเตอร์อื่น ๆ อาทิ เช่น ผลได้ (yield) และอัตราผลผลิต (productivity) ซึ่งมีขั้นตอนการหาโดยตรงดังนี้

เตรียมหลอดแอมเพนดอร์ฟที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 2 หลอด



ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปในหลอด



นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที



เทส่วนที่แขวนลอยออก



นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน



คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

Cx (กรัม/ลิตร) = น้ำหนักหลอดทดลองและเซลล์แห้ง (กรัม) - น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)
แล้วคูณด้วยปริมาตรของตัวอย่าง (1000 มิลลิลิตร) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็นกรัมต่อลิตร

3.1.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

3.1.3.1 เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ดังต่อไปนี้

- จานเพาะเชื้อ (petri dishes) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA
- แท่งแก้วสำหรับเกลี่ยและแอลกอฮอล์
- ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรอบฆ่าเชื้อ
- น้ำกลั่นใส่หลอดทดลองหลอดละ 9.9 มิลลิลิตรนำไปฆ่าเชื้อที่ 121

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3.2 เก็บตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการเจือจางให้เหมาะสมโดย

เลือกกระดับการเจือจางตัวอย่างละ 3 ระดับ แต่ละระดับดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อ 2 ซ้ำ เกลี่ยด้วยแท่งแก้วตามเทคนิคการ spread plate

3.1.3.3 นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากระดับการเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อตัวอย่าง 1 ลิตร ดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/ลิตร)} = \text{จำนวนโคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ} \times \text{dilution factor} \times 10,000$$

4. การเพาะเลี้ยงและการวัดอัตราการเจริญของ *E. coli* pTX0161

4.1 เลี้ยง *E. coli* pTX0161

4.1.1 นำ *E. coli* pTX0161 เลี้ยงในอาหาร terrific broth ที่มีปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงไว้ในเครื่องเขย่าฟลาสก์ (reciprocal shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 – 12 ชั่วโมง

4.1.2 นำ *E. coli* pTX0161 ที่มีปริมาตร 30 มิลลิลิตร แบ่งใส่ในฟลาสก์ 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ ที่มีอาหาร terrific broth อยู่ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงไว้ในเครื่องเขย่าฟลาสก์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 – 12 ชั่วโมง

4.1.3 นำเชื้อ *E. coli* pTX0161 จากข้อ 2.1.2 ใส่ลงไปในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด complex medium อยู่ 3 ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* pTX0161 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.2 วัดการเจริญ

4.2.1 เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงในแต่ละชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่าง 2 ข้ำ โดยเริ่มเก็บจากชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 12 เก็บตัวอย่าง อย่างละ 1 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4.2.2 นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อ่านค่าและบันทึกผล วาดกราฟ

4.3 การหาน้ำหนักแห้ง

4.3.1 ชั่งน้ำหนักหลอดแอบเพนดอร์ฟเปล่าบันทึกผล

4.3.2 เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงโดยเริ่มเก็บจากชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 12 เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรโดยแต่ละชั่วโมงเก็บตัวอย่าง 2 ข้ำ ใส่ในหลอดแอบเพนดอร์ฟ

4.3.3 นำหลอดแอบเพนดอร์ฟไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 13,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที

4.3.4 *E. coli* pTX0161 จะตกตะกอน เทส่วนที่เป็นสารละลายใสออก

4.3.5 นำไปอบไว้ในตู้อบ ที่ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 – 24 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้วนำมาชั่ง บันทึกผล

4.3.6 นำค่าหลอดแอมเพนดอร์ฟที่มี *E. coli* pTX0161 แห่งลบออกจากค่าหลอดแอมเพนดอร์ฟเปล่าจะได้น้ำหนักแห้งบันทึกผลและวาดกราฟ

4.4 การผลิตเซลล์ (Cell production)

4.4.1 การหมัก

นำเชื้อ *E. coli* pTX0161 ที่ได้จากการ inoculum เพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส pH 6.8 – 6.9 , $pO_2 > 20\%$, ความเร็วรอบใบพัด 200 – 400 รอบต่อนาทีและให้อากาศ เริ่มต้นที่ 1 vvm ทำการหมัก 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ ชั่วโมงโดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ เพื่อนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ ชั่วโมงโดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ เพื่อนำไปหาค่าน้ำหนักแห้งของ *E. coli* pTX0161 บันทึกผลค่าทั้งสองและนำมาวาดกราฟ

4.4.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvest)

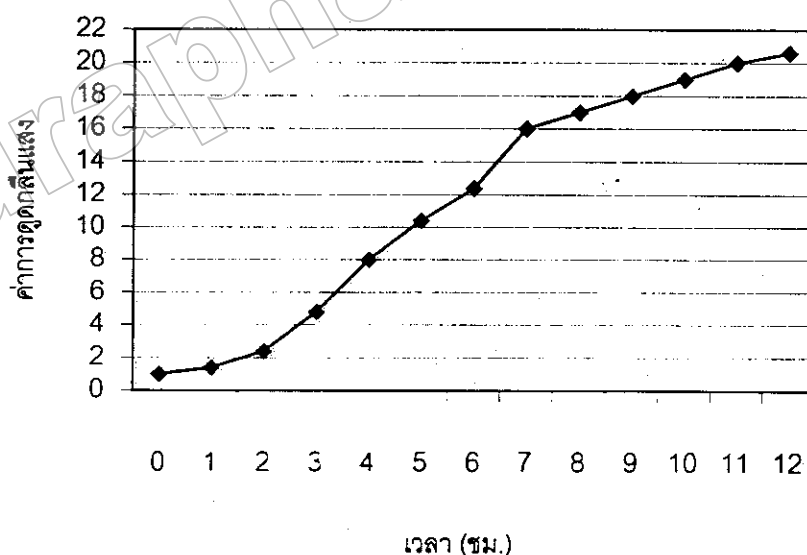
เมื่อทำการหมักเสร็จแล้วนำเซลล์ในถังหมักทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เติสารละลายส่วนใส (supernatant) ออกให้เหลือแต่เซลล์นำเซลล์ที่ได้ไปแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก จ

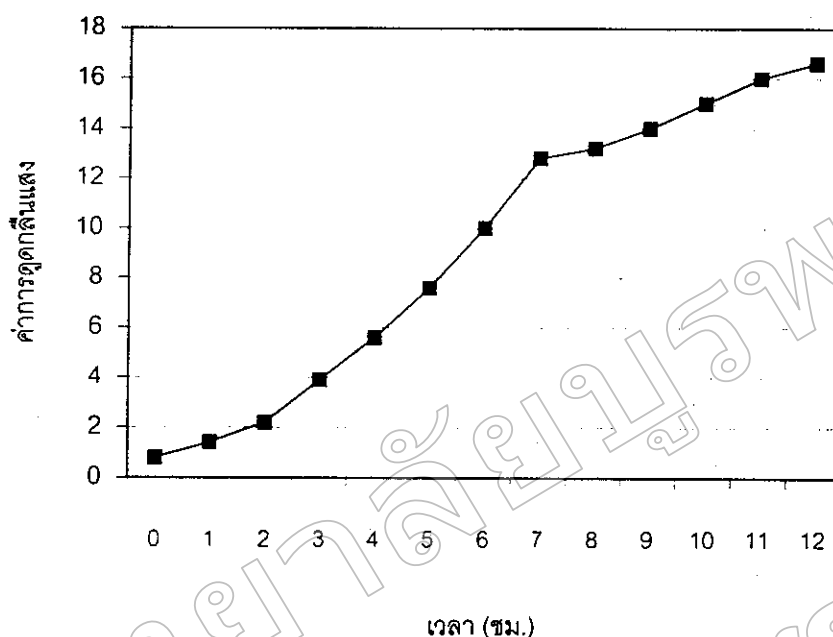
การผลิตเซลล์แบบ batch fermentation

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* pTX 0161 โดยใช้การหมักแบบกะโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.8 – 6.9, $pO_2 \leq 20$, อัตราการกวนใบพัด 200 – 400 รอบต่อนาที และให้อากาศเริ่มต้นที่ 0.25 – 1 vvm ทำการหมัก 12 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 12 ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ ชั่วโมง โดยทำการเก็บ 2 ข้ว เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ 600 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำหนักแห้งของ *E. coli* pTX 0161 พบว่า

ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงการเจริญของ *E. coli* pTX 0161 และใน 3 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 3- 10 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง และจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไปหลังจาก 10 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากในระยะแรกอยู่ในช่วง lag phase ซึ่งเป็นระยะที่ไม่มีการแบ่งจำนวนเซลล์ หรือแบ่งจำนวนในปริมาณน้อยและเป็นระยะการปรับตัวของแบคทีเรียให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ และช่วงชั่วโมงที่ 3 เป็นต้นไป จะอยู่ในระยะ log phase เป็นระยะที่ *E. coli* จะเจริญอย่างเต็มที่ ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2



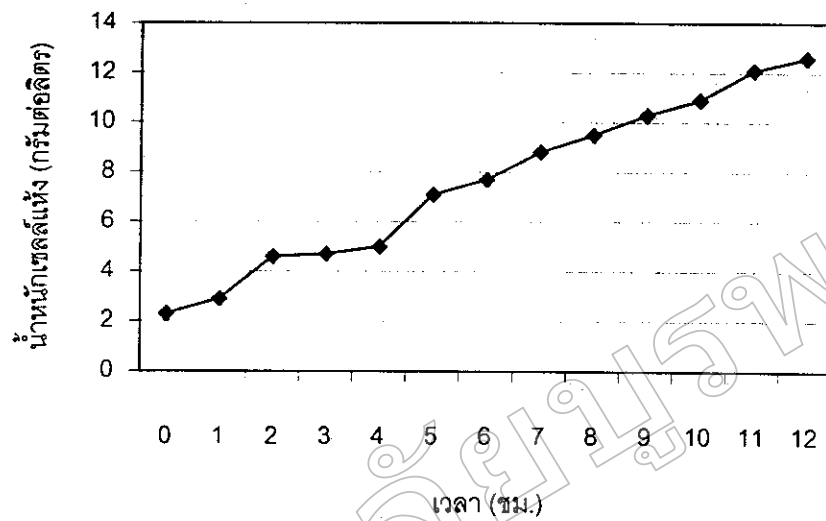
ภาพภาคผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะใน
ถึงหมักขนาด 10 ลิตร



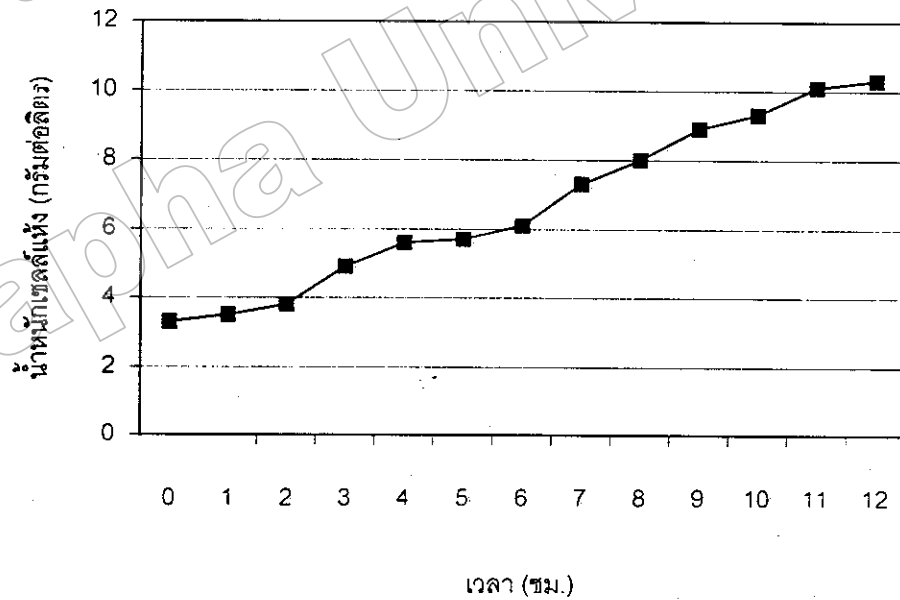
ภาพภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะใน
ถึงหมักขนาด 5 ลิตร

จากกราฟภาพที่ 1 และ 2 พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในถึงหมักขนาด 5 ลิตร และ 10 ลิตร
แบบกะแนวโน้มค่าการดูดกลืนแสงของกราฟจะเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ ในช่วงชั่วโมงที่ 0 – 3
ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่เมื่อผ่านไปชั่วโมงที่ 3 กราฟจะเริ่มชันขึ้นค่าการดูดกลืน
แสงเริ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นช่วง *E. coli* มีการแบ่งเซลล์สูงจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงจะ
เพิ่มขึ้นไม่มากความชันของกราฟเริ่มจะคงที่ แสดงว่าเซลล์มีการเจริญลดลงเพราะว่าอาหารที่เป็น
แหล่งคาร์บอนเริ่มหมดลงเซลล์ก็จะเริ่มหยุดการเจริญ

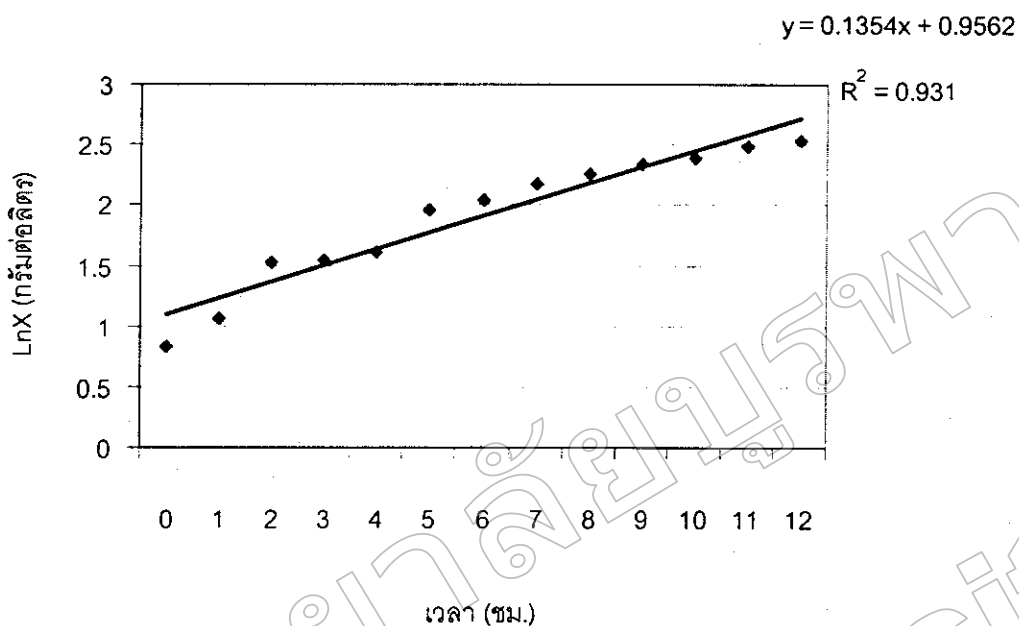
จากการหาน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของ *E. coli* pTX 0161 ใน
ถึงหมักแบบกะเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 12 ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้
นำไปอบในตูบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งพบ
ว่า ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* pTX 0161 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-3 ชั่วโมงแรกของการ
เพาะเลี้ยงเซลล์ และในช่วงชั่วโมงที่ 3 – 10 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว
และหลังจากชั่วโมงที่ 10 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



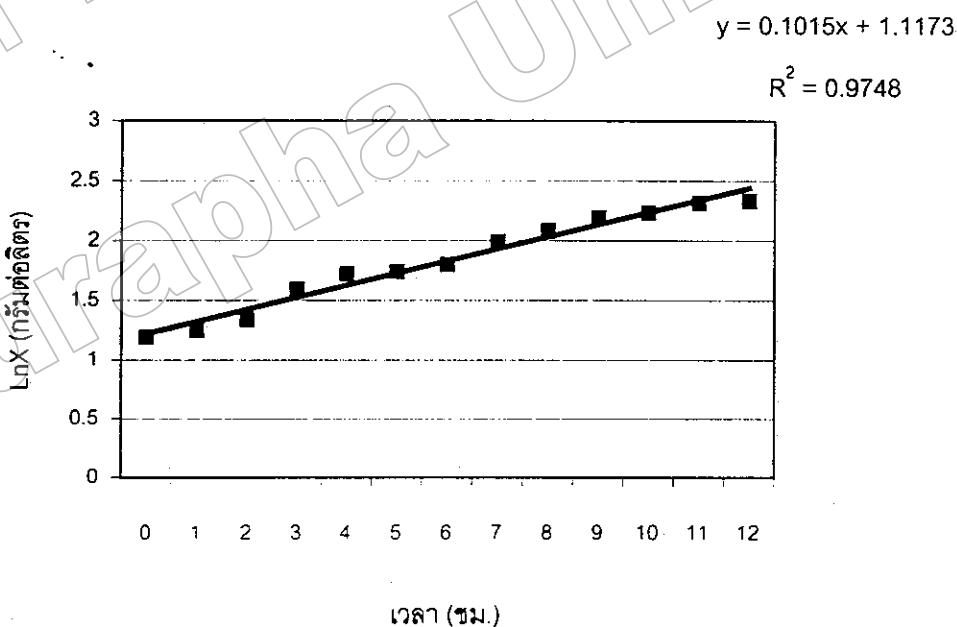
ภาพภาคผนวกที่ 3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะ
ในถังหมักขนาด 10 ลิตร



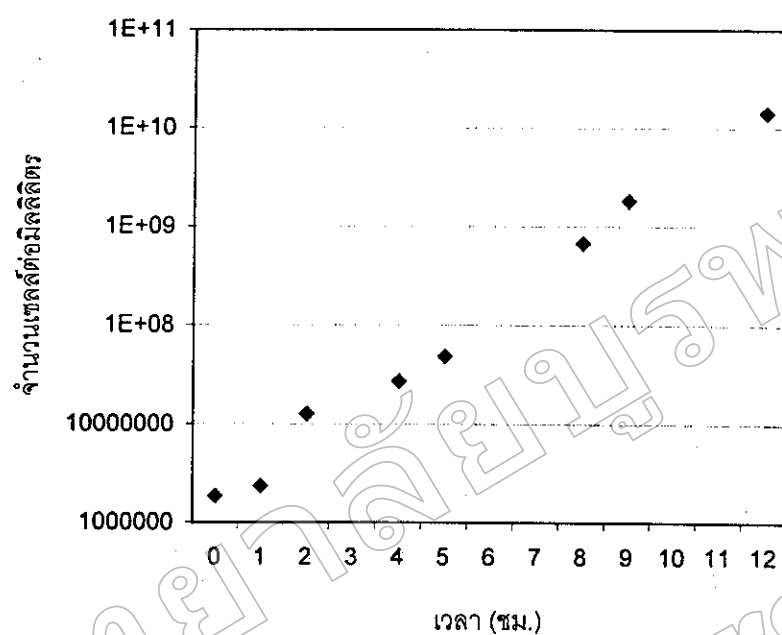
ภาพภาคผนวกที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะ
ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



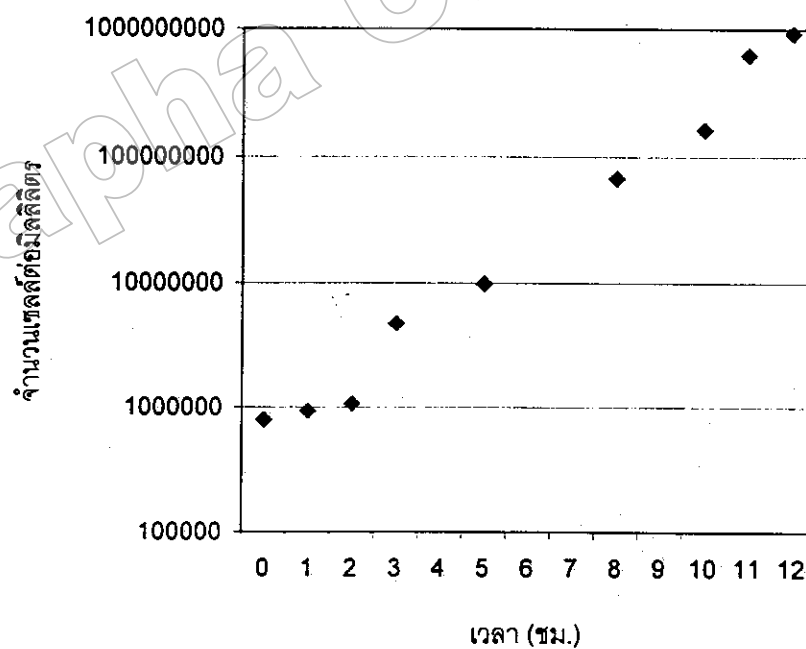
ภาพภาคผนวกที่ 5 LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมัก
ขนาด 5 ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 6 LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะในถังหมัก
ขนาด 10 ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 7 จำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะใน
ถังหมักขนาด 10 ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 8 จำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบกะใน
ถังหมักขนาด 5 ลิตร

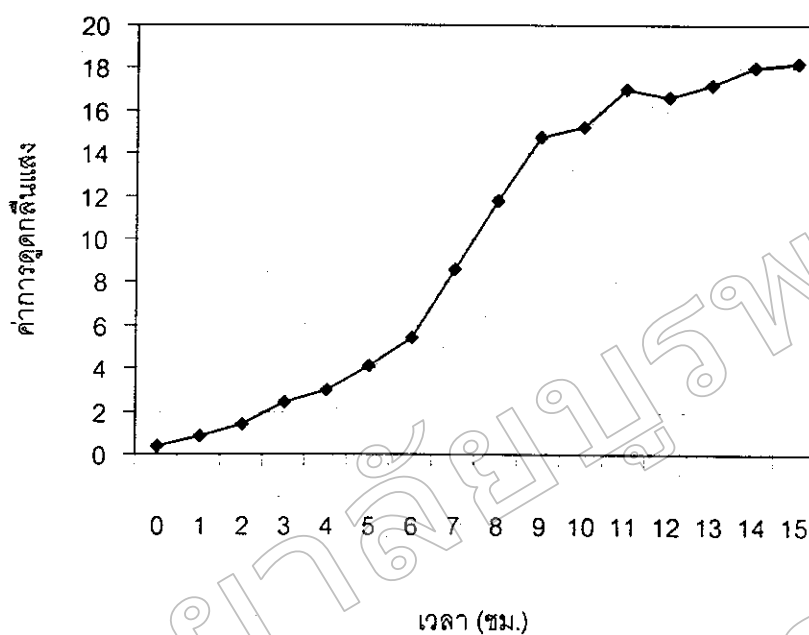
จากกราฟภาพที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 จะพบว่าการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 10 ลิตร แบบกะแนวโน้มค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง LnX และ จำนวนเซลล์ของกราฟจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือในช่วงชั่วโมงที่ 0 – 3 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เพราะเป็นช่วงในการปรับตัวกับอาหาร (lag phase) หลังจากผ่านชั่วโมงที่ 3 ไปกราฟจะเริ่มชันขึ้นค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นช่วง *E. coli* มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้มีการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 10 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นไม่มาก ความชันของกราฟเริ่มจะคงที่ แสดงว่าเซลล์มีการเจริญลดลงเพราะว่าอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มลดลงเซลล์จะได้รับอาหารในปริมาณน้อยทำให้การเจริญลดลง

จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงและค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน เพราะค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นตัวบอกให้รู้ถึงอัตราการเจริญของเซลล์ถ้าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงขึ้นอัตราการเจริญของเซลล์ก็จะมากขึ้นด้วย

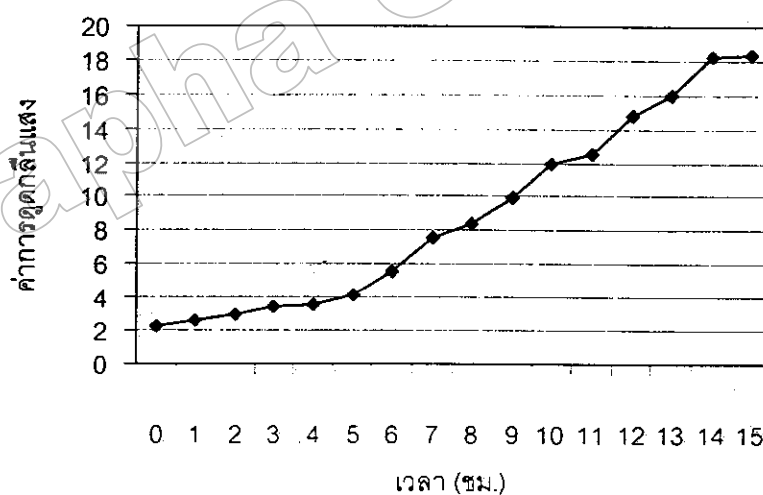
การผลิตเซลล์แบบครั้งคราว

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* pTX 0161 โดยใช้การหมักแบบครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.8 – 6.9, $pO_2 \leq 20$, อัตราการวนของใบพัด 200 – 400 รอบต่อนาที และ อากาศเริ่มต้นที่ 0.25 – 1 vvm ทำการหมัก 15 ชั่วโมง ใช้สูตรอาหารการเลี้ยงเหมือนกับการเลี้ยงแบบกะ แต่ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเริ่มต้นไม่มีการใส่กลีเซอรอลที่เป็นแหล่งคาร์บอน เริ่มทำการไหลอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ซึ่งสูตรอาหารที่ใช้สำหรับทำการไหลอาหาร (ภาคผนวก ค)

การเก็บตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 15 โดยทำการเก็บ 2 ข้าง เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* pTX 0161 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงการเจริญของ *E. coli* pTX 0161 และใน 5 - 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงหลังจากนั้นค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 5 - 10 ของการเพาะเลี้ยง และจะเริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไปหลังจาก 10 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากในระยะแรกอยู่ในช่วงระยะที่ไม่มีการแบ่งจำนวนเซลล์ หรือแบ่งจำนวนในปริมาณน้อยและเป็นระยะการปรับตัวของแบคทีเรียให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้แบคทีเรียมีการเจริญที่ช้าและหลังจากช่วงชั่วโมงที่ 5 เป็นต้นไปแบคทีเรียมีการปรับตัวและได้รับอาหารอย่างต่อเนื่องทำให้มีการเจริญที่รวดเร็วขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10



ภาพภาคผนวกที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบ
ครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 1

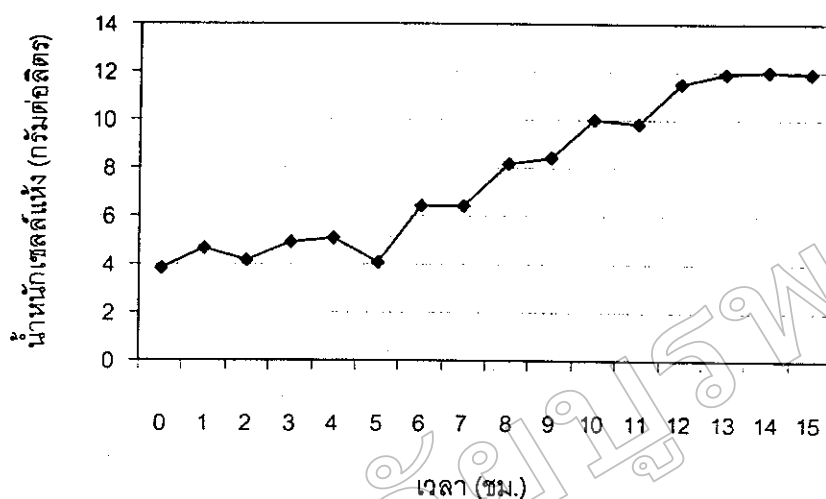


ภาพภาคผนวกที่ 10 การดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบ
ครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2

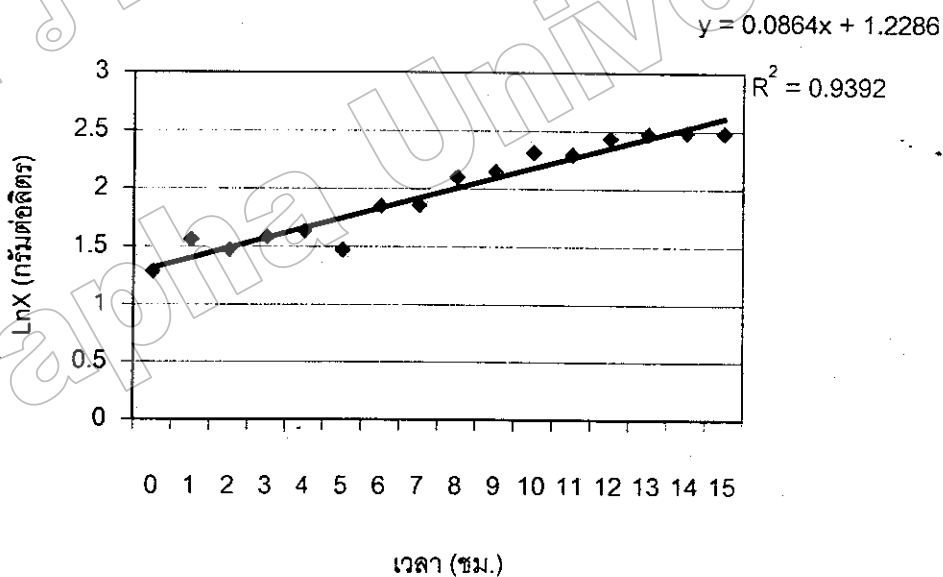
จากกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟเลี้ยงแบบกะ พบว่าปริมาณค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกับการเลี้ยงแบบกะ แต่จะสังเกตเห็นได้ว่าในช่วงระยะชั่วโมงแรก ๆ เซลล์จะมีการเจริญที่ช้ากว่าการเลี้ยงแบบกะอาจเป็นเพราะว่าอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนในช่วงแรกมีปริมาณที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟเลี้ยงแบบกะที่ใส่อาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนลงไปเลยตั้งแต่เริ่มทำการเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์ได้รับอาหารอย่างพอเพียงในช่วงชั่วโมงแรก ๆ จึงมีการเจริญที่ต่ำกว่าการเลี้ยงแบบครั้งคราว และช่วงเวลาการไหลอาหารก็มีส่วนเกี่ยวข้องเพราะในช่วงชั่วโมงเริ่มต้นจะใช้ปริมาณอาหารสำหรับไหลค่อนข้างต่ำ ซึ่งใน 1 ชั่วโมง จะต้องไหลอย่างต่อเนื่องแต่ในการไหลอาหารจะทำการไหลอย่างต่อเนื่องไม่ได้เพราะอาหารที่เราไหลเข้าไปมากเกินไปจนความเป็นจริงที่เราต้องการ เช่น ในช่วงชั่วโมงแรกเราใช้อาหารสำหรับไหล 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเฉลี่ยแล้วใน 1 นาที ต้องไหลอาหารปริมาณ 2 มิลลิลิตร แต่ปั๊มที่ใช้ไหลอาหารไม่สามารถควบคุมปริมาณการไหลอาหารในปริมาณที่ต้องการไม่ได้ จึงต้องแบ่งออกเป็น 4 ช่วง ช่วงละ 15 นาที ในการไหลอาหาร 1 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ในช่วงชั่วโมงแรก ๆ เซลล์จึงได้รับอาหารไม่ต่อเนื่องทำให้เซลล์มีการเจริญไม่เต็มที่

ทั้งนี้ในการทดลองจึงต้องใช้ปั๊มสำหรับไหลอาหารที่มีขนาดและปริมาณที่เหมาะสมกับที่เราต้องการโดยที่ปั๊มที่ใช้มันต้องสามารถไหลอาหารในปริมาณที่น้อย ๆ ได้และสามารถควบคุมความเร็วรอบที่เราต้องการได้

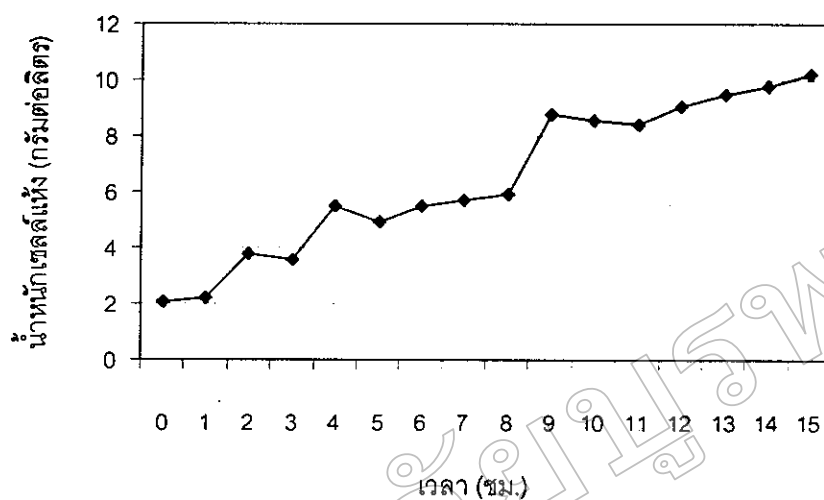
จากการหาน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของ *E. coli* pTX 0161 ในถังหมักแบบครั้งคราวเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 15 ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* pTX 0161 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-3 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์ และในช่วงชั่วโมงที่ 3 - 10 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 10 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะเริ่มคงที่ดังแสดงในภาพที่ 11 และ 13



ภาพภาคผนวกที่ 11 จำนวนเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบ
ครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 1



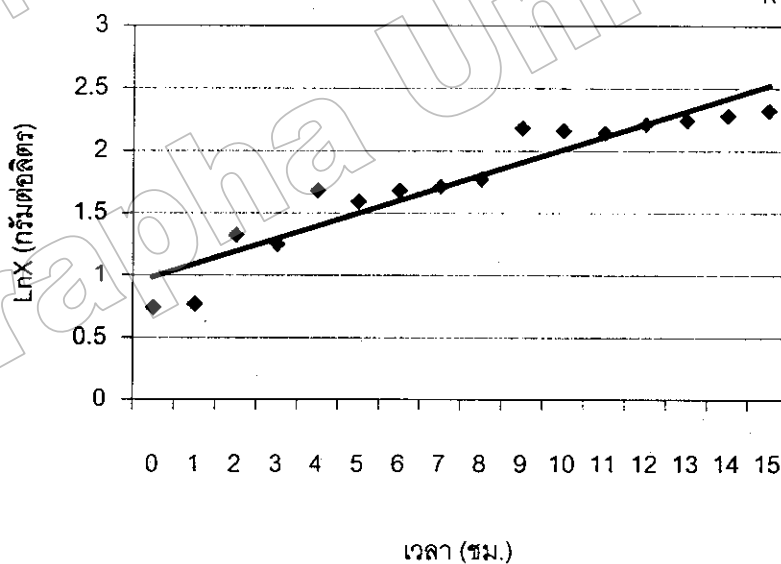
ภาพภาคผนวกที่ 12 LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวใน
ถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2



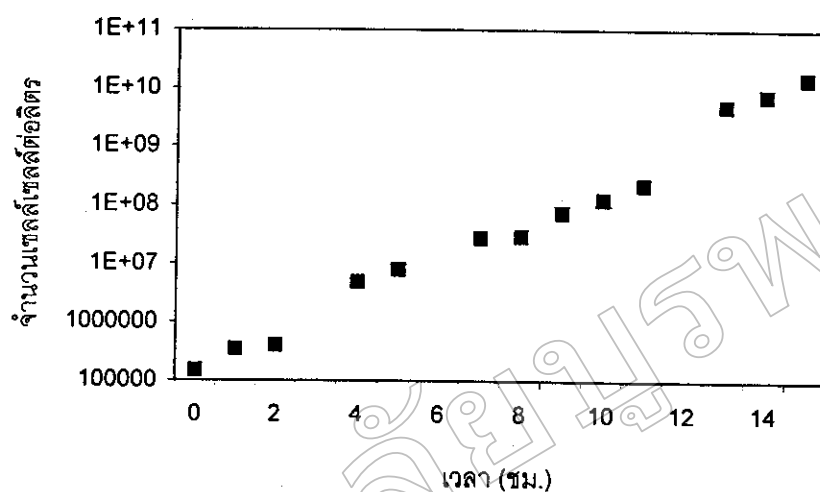
ภาพภาคผนวกที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบ
ครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2

$$y = 0.1025x + 0.881$$

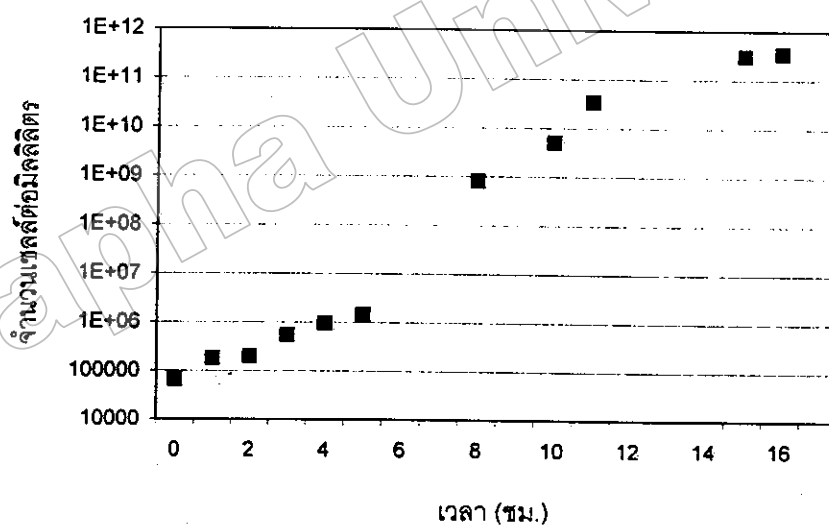
$$R^2 = 0.8901$$



ภาพภาคผนวกที่ 14 LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบครั้งคราวใน
ถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2



ภาพภาคผนวกที่ 15 จำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบ
ครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 1

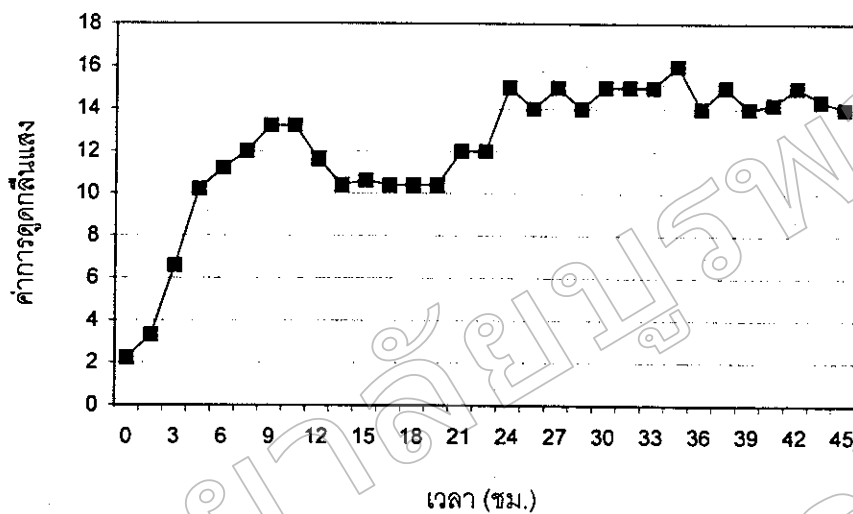


ภาพภาคผนวกที่ 16 จำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบ
ครั้งคราวในถังหมักขนาด 10 ลิตร ครั้งที่ 2

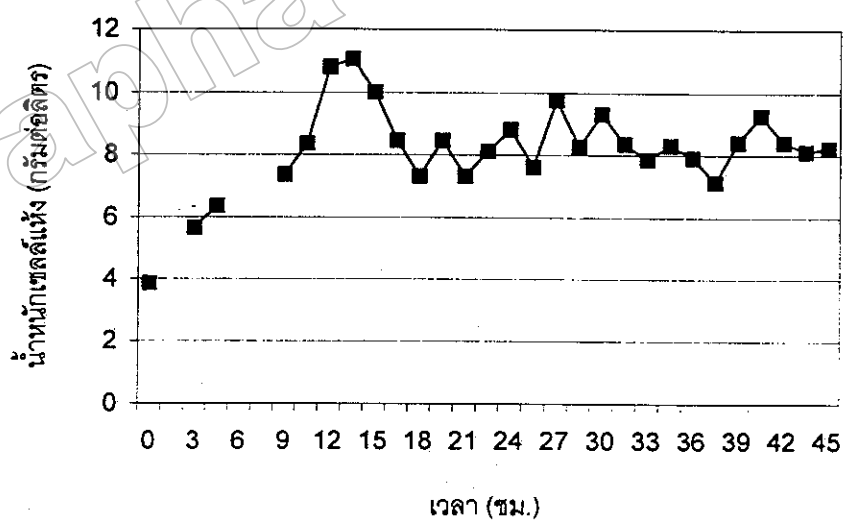
จากกราฟภาพที่ 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 จะพบว่าการเลี้ยงเซลล์ในถังหมัก 10 ลิตร แบบครั้งคราวแนวโน้มค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง LnX และ จำนวนเซลล์ของกราฟจะเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเลี้ยงแบบกะ และปริมาณของเซลล์ที่ได้หลังจากหาค่าน้ำหนักแล้วก็มีค่าไม่ต่างกันมาก ซึ่งตามความเป็นจริงแล้วในการเลี้ยงเซลล์แบบครั้งคราวจะให้ผลผลิตเซลล์ที่สูงกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบกะ แต่จากการทดลองที่ได้ผลผลิตที่ได้มีอัตราที่ใกล้เคียงกันทั้งนี้อาจเกิดจากปัญหาของเทคนิคการไหลอาหารลงในถังหมักซึ่งต้องไหลอาหารตลอดเวลาในการเลี้ยงให้เซลล์ที่เราเลี้ยงได้รับอาหารอย่างต่อเนื่อง แต่การทดลองนี้ไม่สามารถที่จะไหลอาหารได้อย่างต่อเนื่องเพราะต้องใช้อาหารในปริมาณที่น้อยมากในช่วงแรก ๆ ของการเลี้ยงเซลล์อย่างที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ในขณะที่ปั๊มที่ใช้ไม่สามารถที่จะควบคุมการไหลอาหารตามที่ต้องการได้ เพราะปั๊มที่ใช้เป็นชนิด peristaltic pump ซึ่งเป็นปั๊มที่เหมาะสมกับการใช้งานที่มีปริมาณค่อนข้างสูง สาเหตุอีกหนึ่งประการมาจากขณะที่ไหลอาหารในปริมาณที่ต่ำต้องใช้ความเร็วรอบของปั๊มต่ำ แต่ภายในถังหมักในขณะที่ทำการเลี้ยงเซลล์จะมีแรงดันที่สูงมากอาหารที่ไหลลงไปด้วยความเร็วรอบต่ำก็ไม่สามารถไหลลงไปในถังหมักได้เพราะเกิดจากแรงดันภายในถังหมักดันอาหารที่เราไหลลงไปให้ย้อนกลับมาจึงเป็นปัญหาในการเลี้ยงเซลล์แบบครั้งคราว ที่ต้องนำมาแก้ไขในการเลี้ยงเซลล์ครั้งต่อไป

การผลิตเซลล์แบบ continuous fermentation

ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงครั้ง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยทำการเก็บ 2 ข้าง เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำหนักแห้งของ *E. coli* pTX 0161 และเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 12 เริ่มทำการไหลอาหารที่เตรียมไว้ลงไปในถังหมัก พร้อมทั้ง feed อาหารออกด้วย ในอัตราการไหลอาหารเข้า: การไหลอาหารออก ประมาณ 2: 1 จนครบชั่วโมงที่ 48 พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 12 มีอัตราการเจริญของเซลล์เหมือนกับการเลี้ยงเซลล์แบบกะและแบบครั้งคราว หลังจากผ่านชั่วโมงที่ 12 แล้วเริ่มทำการไหลอาหารลงไปด้วยรวมทั้งไหลอาหารออก พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์มีลักษณะคงที่ไม่ต่างกับชั่วโมงที่ 12 ดังกราฟภาพที่ 17 และ 18



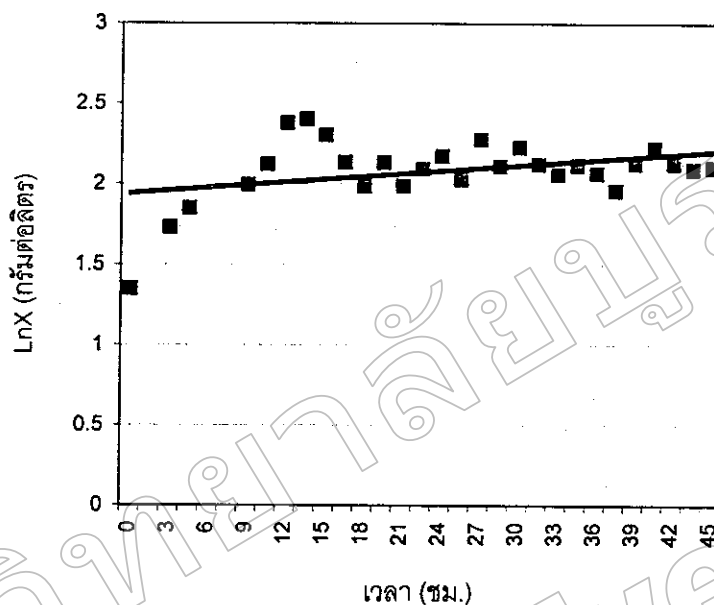
ภาพภาคผนวกที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161
แบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อ
เนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร

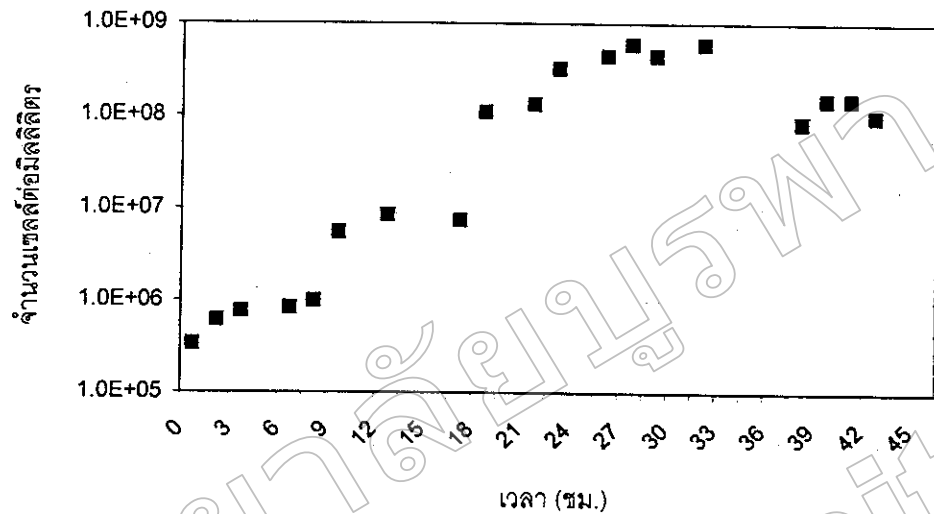
$$y = 0.0087x + 1.9316$$

$$R^2 = 0.1378$$



ภาพภาคผนวกที่ 19 LnX ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อเนื่องใน
ถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการหาน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของ *E. coli* pTX 0161 ในถังหมักแบบต่อเนื่องเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงครั้ง ตัวอย่างที่ได้นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีทิศทางสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้โดยที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 12 เซลล์จะมีการเจริญอย่างต่อเนื่องดังกราฟที่แสดงไว้ข้างต้น และเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 12 เริ่มทำการไหลอาหารลงไปกราฟเริ่มชันลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดชั่วโมงที่ 48 แสดงว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 48 เซลล์จะมีการเจริญคงที่ เพราะว่าที่ชั่วโมงที่ 12 อาหารที่อยู่ในถังหมักถูกใช้ไปเกือบหมดแล้วทำให้เซลล์หยุดการเจริญ เมื่อมีการไหลอาหารลงไปพร้อมทั้งไหลอาหารออกตามไปด้วยจะทำให้เซลล์ได้รับอาหารในอัตราคงที่ตลอดจนสิ้นสุดชั่วโมงที่ 48 ดังนั้นเซลล์จะมีอัตราการเจริญคงที่เช่นกันดังเช่นกราฟจำนวนเซลล์ที่นับได้



ภาพภาคผนวกที่ 20 จำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* pTX 0161 แบบต่อเนื่อง
ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาจำนวนเซลล์ พบว่าอัตราการเจริญของ *E. coli* pTX 0161 ในถังหมัก
แบบต่อเนื่องเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงครึ่ง
จำนวนเซลล์ที่นับได้จะมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงและค่าน้ำหนักเซลล์แห้งไปในทิศทาง
เดียวกัน คือหลังจากชั่วโมงที่ 12 จำนวนเซลล์ที่นับได้จะไม่ต่างกันมากเซลล์จะมีอัตราการเจริญที่
ค่อนข้างคงที่

ภาคผนวก จ

ตารางภาคผนวกที่ 1 การหาความบริสุทธิ์ของพลาสติกดีเอ็นเอจากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line

Static Mixer ที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายต่างแก่:

สารทำให้เป็นกลาง 125: 250: 125, 250: 500: 250 และ 500: 1,000: 500

มิลลิลิตรต่อนาทีและปริมาณพลาสติกดีเอ็นเอที่คำนวณได้

ที่ 125:250	LYSIS TUBE LENGTH (m)	OD260										MEAN	SD	SE
		R1	R2	R3	R4	R5	pDNA		pDNA		pDNA mg/gcwt			
							conc	(mg/gCWT)	conc	(mg/gCWT)				
A	0.3	0.3793	0.4087	0.4375	0.6021	0.6812	9.47	10.21	10.92	8.35	9.45	9.68	0.959643	0.6785766
B	0.6	0.4367	0.3936	0.3661	0.4771	0.6021	10.90	9.83	9.14	6.62	8.35	8.97	1.613995	1.1412778
C	0.9	0.3561	0.3847	0.3805	0.5351	0.5351	8.89	9.61	9.50	7.42	7.42	8.57	1.0811106	0.764468

ที่ 250:500	LYSIS	OD260					MEAN	SD	SE					
	TUBE													
	LENGTH													
	(m)	R1	R2	R3	R4	R5	conc (mg/gCWT)	conc (mg/gCWT)	conc (mg/gCWT)	pDNA mg/gcwt	pDNA mg/gcwt			
AA	0.3	0.51	0.4999	0.4275	0.4771	0.4771	12.74	12.48	10.68	6.62	6.62	9.83	3.0338898	2.1453046
BB	0.6	0.436	0.3956	0.3877	0.3802	0.6021	10.89	9.88	9.68	5.27	8.35	8.81	2.1751761	1.5380965
CC	0.9	0.3587	0.3351	0.3119	0.6021	0.4260	8.96	8.37	7.79	8.35	5.91	7.88	1.1738391	0.8300376
control		0.3423	0.3843	0.3388	0.4260		8.55	9.60	4.70	5.91		7.19	2.2709897	1.6058476

1500:1000

LYSIS TUBE LENGTH (m)	OD260	R1			R2			R3			R4			R5			pDNA			pDNA			pDNA mg/gcwt	pDNA mg/gcwt	pDNA mg/gcwt	SE
																	conc	(mg/gCWT)	conc	(mg/gCWT)	conc	(mg/gCWT)				
AAA	0.3	0.3211	0.2428	0.2625	0.2041	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	0.2663	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55	3.69	7.54	2.1289651	1.5054201
BBB	0.6	0.2221	0.2794	0.2734	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	6.83	6.83	6.83	6.83	6.83	6.83	4.70	7.98	1.1081045	0.7835558
CCC	0.9	0.2003	0.2051	0.2238	0.426	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	0.3802	5.59	5.59	5.59	5.59	5.59	5.59	5.27	7.47	0.3691974	0.2610845
control				0.3736	0.3736												5.18	5.18	5.18	5.18	5.18	5.18		7.19	0	0

125:250:125 IYSIS+NIUTRALISATION

TUBI LENGTH (m)	OD260	R1			R2			R3			R4			R5			pDNA			pDNA			pDNA mg/gcwt	pDNA mg/gcwt	pDNA mg/gcwt	SE
																	conc	(mg/gCWT)	conc	(mg/gCWT)	conc	(mg/gCWT)				
D	0.3	0.3641	0.3413	0.3574	0.3802	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	0.3388	13.50	13.50	13.50	13.50	13.50	13.50	6.98	10.85	3.1687887	2.2406935
E	0.6	0.3384	0.2812	0.2723	0.4771	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	0.4260	12.55	12.55	12.55	12.55	12.55	12.55	8.78	10.34	1.3832684	0.9781278
F	0.9	0.2734	0.2600	0.2175	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	0.4771	10.14	10.14	10.14	10.14	10.14	10.14	9.83	9.50	0.821983	0.5812354

พื้250:500:250LYSIS+NEUTRALISATION

	TUBE LENGTH (m)	OD260					pDNA					MEAN	SD	SE
		R1	R2	R3	R4	R5	(mg/gCWT)	(mg/gCWT)	(mg/gCWT)	conc	mg/gcwt			
							conc	conc	conc	pDNA	pDNA			
DD	0.3	0.3522	0.3554	0.3060	0.3802	0.3388	13.06	13.18	11.35	7.83	6.98	10.48	2.9140286	2.0605492
EE	0.6	0.4000	0.3211	0.3658	0.3388	0.3010	14.84	11.91	13.57	6.98	6.20	10.70	3.9001527	2.7578509
FF	0.9	0.3507	0.3329	0.3206	0.3388	0.3010	13.01	12.35	11.89	6.98	6.20	10.09	3.2258774	2.2810616

พื้500:1000:500 LYSIS+NEUTRALISATION

	TUBE LENGTH (m)	OD260					pDNA					MEAN	SD	SE
		R1	R2	R3	R4	R5	(mg/gCWT)	(mg/gCWT)	(mg/gCWT)	conc	mg/gcwt			
							conc	conc	conc	pDNA	pDNA			
DDD	0.3	0.1416	0.1232	0.1086	0.0792	0.1015	5.25	4.57	4.03	2.94	3.76	5.70	0.8682628	0.6139604
EEE	0.6	0.1140	0.1115	0.1226	0.2341	0.1249	4.23	4.14	4.55	8.68	4.63	7.27	1.9328236	1.3667258
FFF	0.9	0.1426	0.1610	0.1350	0.1249	0.0792	5.29	5.97	5.01	4.63	2.94	6.26	1.1341796	0.8019936

- A การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 125: 250 ระยะทาง 30 ซม.
- B การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 125: 250 ระยะทาง 60 ซม.
- C การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 125: 250 ระยะทาง 90 ซม.
- AA การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 250: 500 ระยะทาง 30 ซม.
- BB การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 250: 500 ระยะทาง 60 ซม.
- CC การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 250: 500 ระยะทาง 90 ซม.
- AAA การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 500: 1000 ระยะทาง 30 ซม.
- BBB การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 500: 1000 ระยะทาง 60 ซม.
- CCC การเก็บตัวอย่าง lysate ที่อัตราการใช้ 500: 1000 ระยะทาง 90 ซม.
- D การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 375: 125 ระยะทาง 30 ซม.
- E การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 375: 125 ระยะทาง 60 ซม.
- F การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 375: 125 ระยะทาง 90 ซม.
- DD การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 750: 250 ระยะทาง 30 ซม.
- EE การเก็บตัวอย่างที่ neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 750: 250 ระยะทาง 60 ซม.
- FF การเก็บตัวอย่างที่ neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 750: 250 ระยะทาง 90 ซม.
- DDD การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 1500: 500 ระยะทาง 30 ซม.
- EEE การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 1500: 500 ระยะทาง 60 ซม.
- FFF การเก็บตัวอย่างที่ neutralised suspension ที่อัตราการใช้ 1500: 500 ระยะทาง 90 ซม.

ตารางภาคผนวกที่ 2 การหาความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอจากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line

Static Mixer ประกอบกับการใช้ถังกวน และการสลายเซลล์ในถังกวนที่อัตรา

การไหลสารแขวนลอยเซลล์: สารละลายต่างแก่: สารทำให้เป็นกลาง

250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาทีและปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่คำนวณได้

ที่ 250:500 LYSIS ผ่านท่อ								
	Time (min)	OD260		pDNA		MEAN	SD	SE
		R1	R2	mg/gcwt	mg/gcwt			
AA	2	0.5283	0.5283	7.33	7.33	7.33	0	0
BB	5	0.5283	0.5283	7.33	7.33	7.33	0	0
CC	10	0.5283	0.4771	7.33	6.62	6.97	0.50225	0.355148
control 250:500		0.4771	0.39	6.62	5.41	6.01	0.854414	0.604168
ที่ 250:500:250 LYSIS+NEUTRALISATION ผ่านท่อ								
	Time (min)	OD260		pDNA		MEAN	SD	SE
		R1	R2	mg/gcwt	mg/gcwt			
DD	5	0.3900	0.2852	8.04	5.88	6.96	1.526884	1.079681
EE	15	0.3174	0.3900	6.54	8.04	7.29	1.057746	0.747947
FF	30	0.3900	0.2852	8.04	5.88	6.96	1.526884	1.079681
D:RUN ผ่านท่อ.xls								
17/2/2005								
ที่ 250:500 LYSIS ในถัง								
	Time (min)	OD260		pDNA		MEAN	SD	SE
		R1	R2	mg/gcwt	mg/gcwt			
AA	2	0.5283	0.4314	7.33	5.98	6.66	0.950548	0.672145
BB	5	0.5283	0.4314	7.33	5.98	6.66	0.950548	0.672145
CC	10	0.4314	0.4771	5.98	6.62	6.30	0.448298	0.316997
control	ก่อนผสม	0.2272	0.1761	3.15	2.44	2.80	0.501269	0.354454
control	1	0.4771	0.39	6.618728	5.410405	6.014566	0.854414	0.604168
control	2	0.39	0.39	5.410405	5.410405	5.410405	0	0
ที่ 250:500:250 LYSIS+NEUTRALISATION ในถัง								
	Time (min)	OD260		pDNA		MEAN	SD	SE
		R1	R2	mg/gcwt	mg/gcwt			
DD	5	0.3522	0.3900	7.26	8.04	7.65	0.550727	0.389427
EE	15	0.3900	0.3174	8.04	6.54	7.29	1.057746	0.747947
FF	30	0.3174	0.3522	6.54	7.26	6.90	0.507019	0.35852

โดยที่ AA การเก็บตัวอย่าง lysate ที่เวลา 2 นาที

BB การเก็บตัวอย่าง lysate ที่เวลา 5 นาที

CC การเก็บตัวอย่าง lysate ที่เวลา 10 นาที

DD การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่เวลา 5 นาที

EE การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่เวลา 15 นาที

FF การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่เวลา 30 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 3 การหาความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอจากการสลายเซลล์ผ่าน In-Line

Static Mixer และการกรองแบบต่อเนื่องที่อัตราการไหลสารแขวนลอยเซลล์:

สารละลายต่างแก้ว: สารทำให้เป็นกลาง 250: 500: 250 มิลลิลิตรต่อนาทีและปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่คำนวณได้

250: 500: 250 Lysis + Neutralisation										
OD 260				pDNA conc (mg/gCWT)	pDNA conc (mg/gCWT)	pDNA conc (mg/gCWT)	Mean	SD	SE	
Tube	Length (m)	R1	R2	R3						
DD	0.3	0.2430	0.2430	0.2167	7.26	7.26	6.47	7.00	0.453652	0.320784
EE	0.6	0.1919	0.1919	0.2167	5.73	5.73	6.47	5.98	0.427778	0.302488
FF	0.9	0.1461	0.2167	0.2430	4.36	6.47	7.26	6.03	1.497085	1.058609
control		0.1684	0.2167	0.3010	5.03	6.47	8.99	6.83	2.00499	1.417755
กรอง		0.3010	0.2430	0.1684	8.99	7.26	5.03	7.09	1.985971	1.404307

DD การเก็บตัวอย่าง neutralised suspension ที่ระยะทาง 30 เซนติเมตร

EE การเก็บตัวอย่างที่ neutralised suspension ที่ระยะทาง 60 เซนติเมตร

FF การเก็บตัวอย่างที่ neutralised suspension ที่ระยะทาง 90 เซนติเมตร

ภาคผนวก ข

Holms (1986) กล่าวว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้ไม่มีการผลิตอะซีเตทเกิดขึ้น แต่ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้ากว่าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และยังทำให้อัตราการขนส่งภายในเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส

Luli and Strohl (1990) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบความหนาแน่นสูง high cell density ความเข้มข้นของอะซีเตทที่มากกว่า 5 กรัมต่อลิตร ที่ pH 7.0 จะมีผลต่อเซลล์ คือ อัตราการเจริญจะลดลง จำนวนเซลล์ลดลงและความหนาแน่นของเซลล์จะต่ำ

Riesenberg et al. (1991) กล่าวว่าในกระบวนการหมักแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับความหนาแน่นสูงควรใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพราะสามารถใช้ควบคุม pH ระหว่างการเลี้ยงเซลล์ได้

Riesenberg et al. (1991) ยังพบว่าในกระบวนการหมักแบบครั้งคราวจะผลิตอะซีเตทได้มากกว่ากระบวนการหมักแบบกะเพราะว่าใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานกว่า แต่สามารถควบคุมปริมาณอะซีเตทได้โดยควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) โดยจำกัดปริมาณอาหารที่ใช้ เช่น แหล่งของคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจน

Lee and Chang (1995) รายงานว่าในกระบวนการหมักแบบครั้งคราวชนิดของอาหารมีส่วนสำคัญมากในการที่ทำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูง ซึ่งควรใช้ชนิดของอาหารที่เป็น define medium เพราะเราสามารถที่จะทราบความเข้มข้นของสารอาหารและสามารถที่จะควบคุมได้ในระหว่างการหมัก

Thatcher et al. (2003) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักกลีเซอรอลจะให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพราะเวลาที่อุณหภูมิห้องกลูโคสจะมีความสามารถในการละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้อยกว่ากลีเซอรอลซึ่งที่อุณหภูมิห้องกลีเซอรอลจะมีคุณสมบัติเป็นของเหลว

ภาคผนวก ช

ผลการทดสอบทางสถิติ

1. การสลายเซลล์ด้วยต่างแก้วผ่าน In-Line Static Mixer

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	N
feed 125.00	15
250.00	15
500.00	15
length .30	15
.60	15
.90	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pdna

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	131.558 ^a	8	16.445	5.708	.000
Intercept	2745.137	1	2745.137	952.917	.000
feed	118.444	2	59.222	20.558	.000
length	8.118	2	4.059	1.409	.258
feed * length	4.996	4	1.249	.434	.783
Error	103.708	36	2.881		
Total	2980.402	45			
Corrected Total	235.265	44			

a. R Squared = .559 (Adjusted R Squared = .461)

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: pdna

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
7.810	.253	7.297	8.324

Post Hoc Tests

feed

Homogeneous Subsets

pdna

Duncan^{a,b}

feed	N	Subset	
		1	2
500.00	15	5.5200	
250.00	15		8.8393
125.00	15		9.0720
Sig.		1.000	.710

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2.881.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

length

Homogeneous Subsets

pdna

Duncan^{a,b}

length	N	Subset
		1
.90	15	7.2740
.60	15	7.8447
.30	15	8.3127
Sig.		.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2.881.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

2. ขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางผ่าน In-Line Static Mixer

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
feed	125.00	15
	250.00	15
	500.00	15
length	.30	15
	.60	15
	.90	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pdna

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	324.651 ^a	8	40.581	6.951	.000
Intercept	3215.310	1	3215.310	550.726	.000
feed	315.825	2	157.912	27.048	.000
length	3.113	2	1.556	.267	.768
feed * length	5.714	4	1.428	.245	.911
Error	210.179	36	5.838		
Total	3750.140	45			
Corrected Total	534.831	44			

a. R Squared = .607 (Adjusted R Squared = .520)

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: pdna

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
8.453	.360	7.722	9.183

Post Hoc Tests

feed

Homogeneous Subsets

pdna

Duncan^{a,b}

feed	N	Subset	
		1	2
500.00	15	4.7080	
125.00	15		10.2287
250.00	15		10.4220
Sig.		1.000	.828

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.838.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

length

Homogeneous Subsets

pdna

Duncan^{a,b}

length	N	Subset
		1
.90	15	8.1187
.30	15	8.4787
.60	15	8.7613
Sig.		.498

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.838.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

ภาคผนวก ณ

วิธีการคำนวณปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ

ขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยต่าง

1. สารแขวนลอยเซลล์ 1,000 มิลลิลิตร + เซลล์ *E.coli* pTX 0161 120 กรัม + สารละลายต่างแก่ 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมเท่ากับ 3,120 มิลลิลิตร
2. นำปริมาตรของสารผสมในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยต่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์
3. ดังนั้นปริมาตรสาร 1.5 มิลลิลิตร มีเซลล์เท่ากับ 3,120 มิลลิลิตร มีเซลล์ 120 กรัม
 $1.5 \text{ มิลลิลิตร มีเซลล์ } 120 \times 1.5/3,120 = 0.0577 \text{ กรัม}$
4. จากนั้นนำปริมาตรสารผสมในขั้นตอนการสลายเซลล์ด้วยต่างปริมาตร 1.5 ลิตร มาทำให้เป็นกลางโดยการเติมสารทำให้ lysate เป็นกลาง 0.5 มิลลิลิตรลงไป
5. ดังนั้นปริมาตรสารในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลาง $1.5 + 0.5 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$ มีเซลล์เท่ากับ 0.0577 กรัม
6. ขั้นตอนต่อไปนำไปทำบริสุทธิ์ด้วย ion exchange chromatography kit miniprep โดยใช้ปริมาตรทั้งหมด 0.6 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์
7. ดังนั้น ปริมาตร 0.6 ลิตร มีปริมาณเซลล์ เท่ากับ 2 มิลลิลิตร มีเซลล์ 0.0577 กรัม
 $0.6 \text{ มิลลิลิตร มีเซลล์ } 0.0577 \times 0.6/2 = 0.0173 \text{ กรัม}$
8. คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ [DNA] = $50 \times OD_{260} \times \text{dilution factor}$
 ในขั้นตอนการ elute ของการทำให้บริสุทธิ์ใช้สาร elute ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ในการ elute สารผสม จากนั้นนำปริมาตรสารผสมที่ได้จากการ elute ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อมาคำนวณหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป
9. เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดจาก 0.6 มิลลิลิตร ที่ได้จากการ elute เท่ากับ

$$= \frac{50 \times OD_{260} \times \text{dilution factor} \times 0.15/0.125}{0.0173}$$

$$= \frac{OD_{260} \times \text{dilution factor} \times 60}{0.017}$$

ขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลาง

1. สารแขวนลอยเซลล์ 1000 มิลลิลิตร + เซลล์ *E.coli* pTX 0161 120 กรัม + สารละลายต่างแก่ 2,000 มิลลิลิตร + สารทำให้ lysate เป็นกลาง 1,000 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมเท่ากับ 4,120 มิลลิลิตร

2. นำปริมาตรของสารผสมในขั้นตอนการทำให้ lysate เป็นกลางปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์

3. ดังนั้นปริมาตรสาร 1.5 มิลลิลิตร มีเซลล์เท่ากับ

4,120 มิลลิลิตร มีเซลล์ 120 กรัม

1.5 มิลลิลิตร มีเซลล์ $120 \times 1.5/4,120 = 0.02912$ กรัม

4. ขั้นต่อไปนำไปทำบริสุทธิ์ด้วย ion-exchange chromatography kit miniprep โดยใช้ปริมาตรทั้งหมด 0.6 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์

5. ดังนั้น ปริมาตร 0.6 ลิตร มีปริมาณเซลล์ เท่ากับ

1.5 มิลลิลิตร มีเซลล์ 0.02912 กรัม

0.6 มิลลิลิตร มีเซลล์ $0.02912 \times 0.6/1.5 = 0.011648$ กรัม

6. คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ [DNA] = $50 \times OD_{260} \times \text{dilution factor}$

ในขั้นตอนการ elute ของการทำให้บริสุทธิ์ใช้สาร elute ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

ในการ elute สารผสม จากนั้นนำปริมาตรสารผสมที่ได้จากการ elute ปริมาตร 125 ไมโครลิตร

ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อมาคำนวณหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

7. เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดจาก 0.6 มิลลิลิตร ที่ได้จากการ elute เท่ากับ

$$= \frac{50 \times OD_{260} \times \text{dilution factor} \times 0.15}{0.125}$$

$$0.011648$$

$$= \frac{OD_{260} \times \text{dilution factor} \times 60}{1}$$

$$0.011648$$

วิธีการคำนวณค่า Re

จากสูตร $Re = \frac{3157QS}{\mu D}$

μD

Q = ปริมาตรรวมของสารผสม (มิลลิลิตรต่อนาที)

S = ความหนาแน่นของ lysate และ neutralisation

โดยที่ ความหนาแน่นของ lysate ประมาณ 1 กิโลกรัมต่อตารางเมตร

ความหนาแน่นของ neutralisation ประมาณ 1.045 กิโลกรัมต่อตารางเมตร

μ = ค่าความหนืดโดยเฉลี่ยที่วัดได้จากเครื่องวัดความหนืด (มิลลิปาสคาลต่อวินาที)

D = เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อแก้วเท่ากับ 0.454 นิ้ว

ค่า Re ภายในท่อแก้วที่มี static element แบบ Kenic type

ค่า Re น้อยกว่าหรือเท่ากับ 950 มีลักษณะการไหลแบบ laminar

ค่า Re อยู่ในช่วง 950 ถึง 8,500 มีลักษณะการไหลแบบ transition

ค่า Re มากกว่า 8,500 มีลักษณะการไหลแบบ turbulent