



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ต้นแบบ 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยง
แบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด

High-Cell-Density Cultivation of Three Model Microorganisms with
Intensively Multiple Sequential Batch Technique

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ 2559

รหัสโครงการ 2559A10802049
สัญญาเลขที่ 90/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ต้นแบบ 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการ
เพาะเลี้ยง

แบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด

High-Cell-Density Cultivation of Three Model Microorganisms with
Intensively Multiple Sequential Batch Technique

ผู้ช่วยศาสตราจารย์เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช) เลขที่สัญญา 90/2559 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณทาง วช. ที่เล็งเห็นความสำคัญของงานด้านวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ และให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

โครงการนี้ได้ดำเนินการสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณหน่วยงานต่าง ๆ ที่ให้ความร่วมมือ และอนุเคราะห์ให้ความช่วยเหลือเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ และข้อมูลต่าง ๆ

คณะผู้วิจัย

ชื่อโครงการ: การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ต้นแบบ 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการ
เพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มข้น

แหล่งเงิน: งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 940,500 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 2 ปี

ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2561

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาการผลิตเซลล์ต้นแบบ 3 ชนิด (*E. coli*, *S. cerevisiae* และ *A. oryzae*) ความเข้มข้นสูง ด้วยสูตรอาหาร BPM โดยใช้โอลิโกเมอร์ของกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ทรีน) ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบางอย่างที่สามารถขยายขนาดนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ทำการศึกษาศักยภาพของอาหารสูตร BPM โดยการใช้ เดกซ์ทรีนที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* และ 60 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* และ *A. oryzae* โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) ในสถานะให้อากาศ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มข้น (Intensively Multiple Sequential Batch Technique) ในระดับถังหมักขนาดบรรจุ 5 ลิตร พบว่าสูตรอาหาร BPM มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะเมื่อมีการเติมยีสต์สกัด ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าการใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพกว่าการใช้กลูโคส *E. coli* มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 37.30, 32.20 และ 31.80 กรัมต่อลิตร ด้วยการหมักแบบสามกะต่อเนื่องในเวลา 36 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตเซลล์สูงถึง 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ย เท่ากับ 0.47 ต่อชั่วโมงและอัตราการใช้น้ำตาลเฉลี่ยเท่ากับ 7.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ *S. cerevisiae* มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 37.27, 38.23 และ 39.03 กรัมต่อลิตร ด้วยการหมักแบบสามกะต่อเนื่องในเวลา 108 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตเซลล์สูงถึง 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ย เท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมงและ อัตราการใช้น้ำตาลเฉลี่ยเท่ากับ 3.32 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *A. oryzae* ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 27.86, 27.95 และ 28.13 กรัมต่อลิตร ด้วยการหมักแบบสามกะต่อเนื่องในเวลา 216 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตเซลล์สูงถึง 0.388 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ย เท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมงและ อัตราการใช้น้ำตาลเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงเทียบเคียงได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch) ทั่วไป

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *A. oryzae*

Research Title: High-Cell-Density Cultivation of Three Model Microorganisms
with Intensively Multiple Sequential Batch Technique

Financial supported by the Research Grant of Burapha University through National
Research Resaerch Council of Thailand

Researcher: Assist.profrssor Dr. Seatthawat Chamsart

Department of biology, Faculty of Science, Burapha University

Abstract

This research was to study the high-cell-density production of *E. coli* and *S. cerevisiae* with the BPM medium using glucose oligomer (dextrin) from cassava starch hydrolysis as carbon source at a high concentration and some techniques for industrial-scaleable cultivation. The potential of BPM medium (Batch Production Medium) with dextrin at a concentration of 100 g/l for *E. coli* and 60 g/l for *S. cerevisiae* and *A. oryzae* was studied using aerobic batch cultivation. The use of technique Intensively Multiple Sequential Batch with BPM medium in a 5-L fermenter gave high efficiency for cell cultivation especially with the supplement of yeast extract. Moreover, it was found that, as carbon source, dextrin was much better than glucose. The BPM with dextrin gave *E. coli* cell concentrations of 37.30, 32.20 and 31.80 g/l with three sequential batches within 36 h. giving a high production rate of 2.88 g/L/h, specific growth rate was 0.47 h⁻¹ and rs was 7.01 g/L/h. Whereas, the cultivation gave *S. cerevisiae* cell concentration of 37.27, 38.23 and 39.03 g/l with three sequential batches within 108 h. giving a high production rate of 1.06 g/L/h, specific growth rate was 0.26 h⁻¹ and rs was 3.32 g/L/h. which was comparable with a normal fed-batch technique. and *A. oryzae* gave the cell of 27.86, 27.95 and 28.13 g/l with three sequential batches within 216 h. giving a high production rate of 0.388 g/L/h, specific growth rate was 0.07 h⁻¹ and rs was 0.48 g/L/h. which was comparable with a normal fed-batch technique.

Keywords: High cell density cultivation, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *A. oryzae*

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง (HCDC: High-Cell Density Cultivation).....	4
วิธีการและเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง.....	6
การพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง.....	9
จุลินทรีย์ต้นแบบ.....	14
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล.....	22
การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบที่ใช้ในการวิจัย.....	22
การศึกษาประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ ในระดับฟลาสก์.....	22
การศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด”	23
การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	27
ผลการศึกษาการศึกษาประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ต้นแบบในระดับฟลาสก์.....	27
ผลการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะต่อเนื่องอย่างเข้มงวด”...	39

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 อภิปรายผล และสรุปผลการทดลอง.....	63
ประสิทธิภาพเด็กซ์ทรีนต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบ.....	63
ความเข้มข้นของเด็กซ์ทรีนต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบ.....	64
เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ-ต่อเนื่อง ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบ.....	65
ประสิทธิภาพของวิธีการทดลองต่อจุลินทรีย์ต้นแบบ.....	66
สรุปผลการทดลอง.....	68
รายงานสรุปการเงิน.....	69
บรรณานุกรม.....	71
ภาคผนวก.....	74
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	81

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1	โครงสร้างโมเลกุลของเดกซ์ทรีน..... 12
2-2	โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคส..... 13
4-1	การเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 28
4-2	การเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> โดยใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน..... 28
4-3	เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ กลูโคส และเดกซ์ทรีน..... 29
4-4	การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 31
4-5	การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน..... 31
4-6	การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้เดกซ์ทรีนร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นแหล่งคาร์บอน..... 32
4-7	เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส เดกซ์ทรีน และเดกซ์ทรีนร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส..... 34
4-8	การเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เดกซ์ทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน..... 36
4-9	การเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เดกซ์ทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน..... 37
4-10	เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน..... 38
4-11	การเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร..... 40
4-12	การเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร..... 40
4-13	การเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร. 41
4-14	เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> ด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร..... 44
4-15	การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร..... 46
4-16	การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร..... 46
4-17	การเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร..... 47

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-18	เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร..... 50
4-19	การเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยใช้เดกซ์ทรีน ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร..... 51
4-20	การเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยใช้ความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร..... 52
4-21	การเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยใช้ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร 53
4-22	เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร..... 55
4-24	ผลการเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง..... 57
4-25	ผลการเพาะเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง 59
4-26	ผลการเพาะเลี้ยง <i>A. oryzae</i> ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง..... 61

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	พารามิเตอร์การเจริญของ <i>E. coli</i> จากการหมักแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรีน ที่ระดับความแตกต่างกัน.....	42
4-2	พารามิเตอร์การเจริญของ <i>S. cerevisiae</i> จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	48
4-3	พารามิเตอร์การเจริญของ <i>A. oryzae</i> จากการหมักแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรีน ที่ระดับความแตกต่างกัน.....	54
4-4	พารามิเตอร์การเจริญของ <i>E. coli</i> จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง.....	58
4-5	พารามิเตอร์การเจริญของ <i>S. cerevisiae</i> จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง	60
4-6	พารามิเตอร์การเจริญของ <i>A. oryzae</i> จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง.....	62

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง (High-Cell-Density Cultivation Technique) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อส่งเสริมการสร้างมวลเซลล์ชีวภาพ (cell biomass) ปริมาณสูง และทำให้ผลิตภัณฑ์ของเซลล์เพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์จำพวก recombinant proteins ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีแนวโน้มทางการตลาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ต่อปี และยังถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมเกษตรเพื่อผลิตอาหาร และ ทางการแพทย์ เพื่อผลิตยา และวัคซีน นอกจากนี้ยังพบการประยุกต์ใช้เพื่อผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ อีกจำนวนจากเซลล์จุลินทรีย์ เช่น มวลเซลล์สำหรับอุตสาหกรรมต่อเนื่องต่าง ๆ โปรไบโอติก โปรตีนเซลล์เดี่ยว กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ต่าง ๆ วัคซีน เป็นต้น

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการค้นพบและใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์จำนวนมาก ทั้งทางด้านอาหาร และพลังงาน เช่น การผลิตอาหารหมักต่าง ๆ พลังงาน เช่น เอทานอล ด้านการแพทย์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วัคซีนชนิดต่าง ๆ และโปรตีนทางการแพทย์สำหรับมนุษย์ (human therapeutic protein) วิธีการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกันรวมทั้งการใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเด่น และมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยจัดเป็นเซลล์ต้นแบบของกลุ่มจุลินทรีย์แต่ละชนิด คือ *Eschilichia coli* (แบคทีเรีย) *Saccharomyces cerevisiae* (ยีสต์) และ *Aspergillus oryzae* (รา) เนื่องจากมีการศึกษามาเป็นระยะเวลานานและมีข้อมูลทางด้านพันธุกรรมจำนวนมาก รวมไปถึงมีความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพจำนวนมาก ทั้งจากสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม

อย่างไรก็ตามยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดในปัจจุบัน ยังมีความแตกต่างกันอย่างมากทั้งสภาวะการเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร และเทคนิคการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูงนั้นมีการใช้เฉพาะวิธีแบบเดิมกะ (fed-batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) เท่านั้น เพื่อลดลดการเกิดปัญหาของการใช้สารวัตถุดิบที่ความเข้มข้นสูงเกินไป จนส่งผลเสียต่อการเจริญของเซลล์เนื่องจาก Crab-Tree effect) และยิ่งกว่านั้นเทคนิคดังกล่าวทั้งสองแบบยังมีวิธีการและการใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยาก และที่สำคัญ คือ เป็นเหตุให้ต้นทุนสูงและใช้เวลามาก

การวิจัยครั้งนี้ ทางทีมงานผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ต้นแบบ ทั้ง 3 ชนิด ให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยการพัฒนาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับระดับอุตสาหกรรมแบบที่ทราบองค์ประกอบอย่างแน่นอน (industrial-defined medium) ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิต

ร่วมกับการใช้โอลิโกเมอร์ของน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้จุลินทรีย์ค่อย ๆ ย่อยและทยอยลำเลียง น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้าเซลล์ เพื่อลดปัญหาการเกิด Crab-Tree effect จากการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงเนื่องจากการคั่งของกลูโคสในเซลล์ ในกระบวนการเพาะเลี้ยง ยิ่งกว่านั้นทางคณะที่วิจัยยังได้พัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะไปสู่เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด”(Intensively Multiple Sequential Batch Technique) โดยการให้อากาศ และมีการควบคุมโดยไบโแพดอย่างเพียงพอ (เข้มงวด) ตามหลักมวลสารสัมพันธ์ (stoichiometry) ให้สามารถได้ผลเทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะที่มีการดำเนินการยุ่งยาก และต้นทุนสูง นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยจะศึกษาการขยายขนาดสู่ระดับโรงงานต้นแบบ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้งานจริงระดับอุตสาหกรรมสำหรับการผลิตมวลเซลล์สำหรับอุตสาหกรรมชีวภาพต่อเนื่องต่าง ๆ ดังที่ทีมงานได้ประสบความสำเร็จมาแล้วในการผลิตชีวมวล *Bacillis* sp.

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารอุตสาหกรรมสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 3 ชนิด เพื่อให้ได้ผลผลิตเซลล์ที่ความเข้มข้นสูง เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. เพื่อศึกษาผลการใช้เดกซ์ทรินที่เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 3 ชนิดเพื่อให้ได้ผลผลิตเซลล์ที่ความเข้มข้นสูง
3. เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด” เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ไม่น้อยกว่าหรือเทียบเคียงได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเดิมมาตรฐานด้วยเทคนิคที่ดีกว่าและเวลาสั้นกว่า
4. เพื่อศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงไปสู่ระดับโรงงานต้นแบบ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาหาสูตรอาหารประเภทที่ทราบองค์ประกอบแน่นอน (defined medium) หรือกึ่งทราบองค์ประกอบแน่นอน (semi-defined medium) ซึ่งมีราคาถูก และมีประสิทธิภาพดี โดยการเติมสารอาหารเสริม เช่น แผลงไนโตรเจนราคาถูกสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 3 ชนิด ให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยงระดับพลาสก์เขย่า

2. ศึกษาการใช้โอไลโกเมอร์ของน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระดับความเข้มข้นให้ได้สูงกว่า 4-5 เท่าของการใช้น้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีทั่วไป ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พร้อมกับการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงในข้อ 3)

3. พัฒนาพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะไปสู่วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด” (Intensively Multiple Sequential Batch Technique) ด้วยการทำซ้ำ 3-7 รอบโดยปราศจากการหยุดระบบเพื่อเตรียมวัตถุดิบใหม่และโดยการให้อากาศ และมีการกวนผสมโดยใบพัดอย่างเพียงพอ ตามหลักมวลสารสัมพันธ์

4. ศึกษาจลนศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ โดยศึกษาการใช้วัตถุดิบและความเข้มข้นของเซลล์ (substrate use and cell growth and) ต่อช่วงเวลาของการเจริญ ของการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก 5 ลิตร และโรงงานต้นแบบ เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของการผลิต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง (HCDC: High-Cell Density Cultivation)

วัตถุประสงค์ที่สำคัญของการหมัก หรือการเพาะเลี้ยง ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม คือเพื่อเพิ่มผลผลิตให้ได้มากที่สุด จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง มาสู่การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการให้สูงขึ้น เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (bio-products) ต่าง ๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จำพวก รีคอมบิแนนซ์โปรตีน (recombinant proteins) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตทางการตลาดสูง เพิ่มขึ้นประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ต่อปี และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นทุก ๆ ปี (Werner, 2004) ปัจจุบันพบว่าการใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ร่วมกับเทคโนโลยีดีเอ็นเอ (DNA Technology) สามารถผลิตโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น Interferon, Interleukins และ Growth Hormone ให้มีปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการใช้ของมนุษย์ในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ อาหาร และอื่น ๆ ได้ (Shojaosadati *et al.*, 2008) ซึ่งหากอาศัยการผลิตจากแหล่งธรรมชาติเพียงอย่างเดียวคงเป็นไปได้ยาก หรือไม่สามารถเป็นไปได้ ที่จะเพียงพอต่อความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านั้น จึงทำให้ในปัจจุบัน การศึกษาวิจัย ทางด้านการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ความเข้มข้นสูงได้รับความสนใจมากในการนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่าง ๆ

ความหมาย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง หมายถึง วิธีการเพาะเลี้ยงหรือการหมักแบบหนึ่งที่สามารถทำให้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก มีอัตราการเจริญเติบโต และการสะสมของเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงได้สำเร็จ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบนี้เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีการผลิตและสะสมผลิตภัณฑ์ รวมไปถึงมีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ในปริมาณที่สูงได้ โดยใช้หลักแนวคิดที่ว่าปริมาณของผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่สร้างได้ขึ้นอยู่กับ 1) ความเข้มข้นของเซลล์ และ 2) ความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ (Fuchs *et al.*, 2001) คือ หากขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์ของเซลล์นั้น เซลล์จะต้องมีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์หนึ่งเซลล์ได้สูง ซึ่งหากต้องการพัฒนาในด้านนี้ ต้องมีการศึกษาลึกลงถึงระดับยีน อาศัยความรู้ทางด้านการตัดต่อยีน โดยค้นหาและปรับเปลี่ยนยีน โปรโมเตอร์ (Promoter) หรือตัวเหนี่ยวนำในการแสดงออกของผลิตภัณฑ์ ให้อินทรีย์นั้นสามารถแสดงออกได้มากขึ้น ต้องอาศัยระยะเวลาที่ยาวนาน รวมไปถึงต้องใช้ความละเอียดในการศึกษาวิจัยอย่างมาก แต่หากขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์นั้น หมายถึงผลิตภัณฑ์จะเพิ่มมากขึ้นถ้าเซลล์มีความเข้มข้นสูง (ได้แก่) ปริมาณการสร้างผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยต่อ

เซลล์ต่อเวลา) ดังนั้นการพัฒนาในส่วนนี้จะสามารถทำได้โดยการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งในด้านการพัฒนาสูตรอาหาร สภาวะการเพาะเลี้ยง และวิธีการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง

โดยทั่วไปวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารชีวภาพ ที่มีความต้องการใช้ หรือมีความจำเป็นในด้านต่าง ๆ ทั้งที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ อุตสาหกรรมทางด้านการแพทย์ และอื่น ๆ ให้สามารถผลิตได้ในปริมาณมากจนเข้าสู่ขั้นอุตสาหกรรมได้ จึงกล่าวได้ว่าวิธีการนี้เป็นอีกทางหนึ่งที่มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อตอบสนองความเจริญก้าวหน้าของเศรษฐกิจและอุตสาหกรรม

ข้อดีและประโยชน์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงนอกจากช่วยให้ได้ผลผลิตปริมาณมากแล้ว ยังมีข้อดีอื่น ๆ อีก ได้แก่ ช่วยในการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตขึ้น ช่วยให้ต้นทุนการผลิตมีราคาถูกลง เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ช่วยลดปริมาณการเพาะเลี้ยงทำให้ไม่ต้องการใช้อุปกรณ์หรือพื้นที่มากในการเพาะเลี้ยง ช่วยทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ง่ายขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของผลผลิตสูงขึ้น ช่วยลดการลงทุนในเรื่องของอุปกรณ์และเครื่องมือ รวมไปถึงช่วยลดปริมาณน้ำเสียจากกระบวนการผลิต เนื่องจากปริมาตรในการเพาะเลี้ยงลดน้อยลง น้ำเสียที่เหลือจากกระบวนการเก็บเกี่ยวจะน้อยลงตามไปด้วย ซึ่งยังส่งให้ความเป็นพิษหรือการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมลดน้อยลง ค่าใช้จ่ายในเรื่องของการบำบัดน้ำเสียก็ลดลงตาม นอกจากนี้ยังช่วยให้มีปริมาณของผลิตภัณฑ์บางตัวที่มีความต้องการใช้อย่างมาก เช่น ในการเป็นยารักษาโรคเพียงพอต่อการใช้อย่างไม่เกิดการขาดแคลน และยังสามารถกระจายลงสู่ประชาชนได้ในทุกระดับเนื่องจากราคาที่ไม่สูงจนเกินไป (Shojaosadati *et al.*, 2008)

ข้อเสียและปัญหา

นอกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบความเข้มข้นสูงมีข้อดีแล้ว ยังมีข้อเสียหลายข้อด้วยเช่นกัน คือ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้อาจทำให้สารตั้งต้น (substrate) จำกัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เอง หากมีการเติมสารตั้งต้นในปริมาณที่มากเกินไป นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการจำกัดในเรื่องของการให้อากาศและการส่งถ่ายออกซิเจนภายในระบบการเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์มีความต้องการใช้ออกซิเจนมาก ทำให้เกิดเป็นสภาวะขาดแคลนออกซิเจนและอาจเข้าสู่สภาวะการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) ได้ บางครั้งเซลล์ที่มากเกินไปอาจเกิดการทำลายตัวเองด้วยกระบวนการเซลล์ไลซิส (cell lysis) และ โปรตีโอะไลติก (proteolysis) นอกจากนี้ความเข้มข้นของเซลล์ที่มากขึ้นจะทำให้อัตราเมตาบอลิซึมที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดความร้อนขึ้นภายในระบบมาก ส่งผลให้การส่ง

ถ่ายความร้อนภายในถังก็จะมีประสิทธิภาพลดลง รวมไปถึงมีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้นด้วย ซึ่งสิ่งที่เกิดขึ้นเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ หรือมีการเปลี่ยนรูปผลิตภัณฑ์ไป เนื่องจากการเปลี่ยนวิธีการเมทาบอลิซึม เช่นมีการสร้างผลพลอยได้ (by-products) เป็นต้น (Shojaosadati *et al.*, 2008)

ในการทดลองทั่วไปจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ปัญหาที่สำคัญ คือ การขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งส่งผลกระทบต่อปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ การสร้างผลพลอยได้ ที่ซึ่งเป็นตัวไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ เป็นต้น ซึ่งปัญหานี้เกิดจากระบบการถ่ายเทออกซิเจนของถังหมักที่มีขายอยู่ในปัจจุบันนั้น มีข้อจำกัด โดยไม่สามารถให้อากาศได้เพียงพอกับการเจริญของเซลล์ที่มีค่าความเข้มข้นสูงได้

วิธีการและเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง (Shojaosadati *et al.*, 2008)

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลัก ๆ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) แบบเติมกะ (Fed-Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) ซึ่งแต่ละชนิดมีวิธีการ การควบคุม รวมไปถึงระยะเวลาในการดำเนินการที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งในการเลือกนำมาใช้นั้นต้องใช้อย่างต่าง ๆ ในการตัดสินใจ เช่นชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ผลผลิตที่ต้องการ รวมไปถึงถึงเทคนิคต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้กระบวนการเพาะเลี้ยงนั้นมีประสิทธิภาพดีขึ้น

การเพาะเลี้ยงแบบกะ

การเพาะเลี้ยงแบบกะ เป็นการเพาะเลี้ยงโดยทำการเตรียมอาหารเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เซลล์จะใช้สารตั้งต้นต่าง ๆ ได้จากสารอาหารเริ่มต้นเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เนื่องจากหลังจากการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นไปแล้วนั้น จะไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เข้าไปอีก รวมถึงจะไม่มีการนำสิ่งใดออก ระหว่างการหมักด้วย ซึ่งจะทำให้การเก็บน้ำหมักทั้งหมดเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เมื่อครบกำหนดเวลาการหมักที่กำหนดไว้ กล่าวได้ว่าในการหมักแบบเบ็ดเสร็จแต่ละครั้งนั้นต้องมีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นใหม่ในทุก ๆ ครั้ง การหมักแบบนี้เป็นที่นิยมมากในโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังหมักสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก มีระบบการกวนเพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึง มีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อเข้าสู่กระบวนการเก็บเกี่ยวในขั้นต่อไป

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไม่มากนัก
2. เชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงจะมีความแข็งแรง เนื่องจากการใช้หัวเชื้อที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutation) ได้ยากด้วย

3. การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย เนื่องจากไม่มีการเปิดระบบเพื่อนำสารอาหารเข้าหรือออก เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ภายนอกจึงเข้าสู่ระบบได้ยาก

4. การควบคุมทำได้ง่ายไม่สลับซับซ้อน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้อุปกรณ์ในการดำเนินการน้อยมาก

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. ต้องเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นและวัตถุดิบต่าง ๆ ใหม่ทุกครั้งที่ดำเนินการหมัก ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

2. ต้องเสียเวลารอเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง เนื่องจากเป็นหัวเชื้อที่เตรียมใหม่ จึงต้องมีการปรับสภาวะของจุลินทรีย์ ให้สามารถใช้อาหารได้

การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

การหมักแบบเติมกะ เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วง ๆ หลังจากที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นแล้ว โดยไม่มีการถ่ายออก ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบกะตรงที่ปริมาณอาหารในการหมักแบบเติมกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเติมกะนั้น ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหมักต่าง ๆ มากที่สุด เช่น การผลิตเพนิซิลิน การผลิตยีสต์ทำขนมปัง เป็นต้น

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบกะหลายประการ เช่น

1. ช่วยลดการยับยั้งของอาหาร (substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กรดน้ำส้ม แอลกอฮอล์ เมทานอล และสารประกอบพวกอะโรมาติก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ แม้ในความเข้มข้นน้อย ๆ ก็ตาม การเติมสารอาหารเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร

2. สามารถผลิตเซลล์ได้ที่มีความเข้มข้นสูง (high-cell concentration) เช่นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงแบบกะโดยทั่วไปนั้น จะได้ปริมาณเซลล์ต่ำไม่เกิน 20 กรัมต่อลิตร

3. ช่วยลดผลจากกลูโคส (glucose effect) คือ การที่เมื่อมีกลูโคสในระบบการเพาะเลี้ยงมากเกินไป ส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสร้างเป็นสารอย่างอื่นขึ้นมาแทนการสร้างเซลล์ ซึ่งสารที่สร้างขึ้นมานั้นอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตเองได้

4. ช่วยลดความหนืดของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น

เดกซ์แทรน (dextran) พูลูลูแลน (pullulan) และ แซนแทนกัม (xanthan gum) ซึ่งหากความหนืดในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ไบโพรพอกวอนจะต้องใช้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้น เกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

5. สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากเป็นระบบที่มีเพียงการเติมสารอาหารเท่านั้น ทำให้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงนั้นไม่ถูกเจือจาง จึงทำให้ได้เปรียบมากกว่าเชื้อชนิดอื่น

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาในระดับสมดุลโดยการดึงน้ำหมักออกบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลที่เท่ากันระหว่างน้ำหมักที่ออกและอาหารใหม่ที่เติมเข้า ทำให้ปริมาตรภายใน อยู่ในสภาวะคงที่หรือสภาวะสมดุล (Steady State) ระบบการหมักแบบต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ Chemostat และ Turbidostat โดย Chemostat เป็นการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติมสารอาหารถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ปรับตามอัตราการไหล ส่วน Turbidostat เป็นวิธีการที่ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกตั้งไว้ในระดับที่คงที่โดยการปรับอัตราการไหล ในทางปฏิบัติ ระบบการหมักแบบ Chemostat ง่ายกว่า Turbidostat เพราะสามารถทำได้โดยการปั๊มที่อัตราไหลคงที่ ส่วน Turbidostat ต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดความขุ่น (Optical Sensing) และเครื่องควบคุมอื่น ๆ ซึ่งมีความยุ่งยากมากกว่า

ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

1. สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ให้คงที่ได้ เนื่องจากมีการเติมสารอาหารใหม่ตลอดเวลา ควบคู่กับการที่มีการดึงสารอาหารเก่าออกพร้อมกับเซลล์บางส่วน ทำให้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในปริมาณที่คงที่ และมีสารอาหารใหม่เข้าไปให้ใช้คงที่เท่ากัน
2. สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ทางเคมีและทางกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่
3. สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่ได้โดยการปรับค่าอัตราการเจือจาง (Dilution Rate, D) ให้คงที่

ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

1. ไม่เหมาะกับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเซลล์จะถูกดึงออกจากกระบวนการหมักในขณะที่เซลล์ยังอยู่ในขั้นของการเจริญเติบโต (Growth Phase) อาจยังไม่เข้าขั้นที่เซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์

2. การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จะทำให้การเจริญของเซลล์เป็นแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานาน ซึ่งอาจเป็นผลให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่น ที่ปนเปื้อนเข้ามาและเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

3. การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้

การพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง

วิธีการเพาะเลี้ยงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากในการที่จะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง และมีการผลิตรีคอมบิแนนซ์โปรตีนในปริมาณสูง เพราะผลกระทบของสิ่งแวดล้อมและสภาวะสารอาหารล้วนแล้วแต่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้การวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการพัฒนาไปในส่วนของการเพิ่มสารอาหาร โดยปัจจัยสำคัญในการพัฒนากลยุทธ์นี้คือการทำให้การเพิ่มสารอาหารนั้นไม่มากเกินไปจนทำให้เกิดการสะสมในถังหมักเกินปริมาณที่เซลล์จำเป็นต้องใช้ หรือไม่ให้น้อยเกินไปจนเซลล์เกิดการขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งการเลือกใช้และการพัฒนาแต่ละกลยุทธ์นั้นต้องมีการพิจารณาจากปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่ การเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ศักยภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ของสารตั้งต้นโดยที่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ สภาวะในการเหนี่ยวนำการสร้างผลิตภัณฑ์ และความสามารถในการวัดค่าตัวแปรต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีทั้งการใช้การเพาะเลี้ยงแบบกะ แบบต่อเนื่อง แบบเติมกะ และอื่น ๆ แต่การเพาะเลี้ยงที่นิยมมากที่สุดคือ เติมหกะ

1. กลวิธีการเพิ่มสารอาหารในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมหกะ

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมหกะเป็นกลวิธีที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงเนื่องจากสามารถขยายเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ สามารถควบคุมสภาวะสำหรับกำหนดปริมาณของสารตั้งต้นและอัตราการใช้สารตั้งต้นในระหว่างการหมักได้ และสามารถควบคุมการสร้างผลพลอยได้ได้ เนื่องจากมีการควบคุมปริมาณของสารตั้งต้นให้เพียงพอกับความต้องการใช้ของจุลินทรีย์เท่านั้น

ในการเพาะเลี้ยงแบบเติมหกะนั้น กลวิธีในการเพิ่มสารอาหารถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดในการทำให้การเพาะเลี้ยงประสบความสำเร็จ ซึ่งมีหลากหลายกลวิธีในการเพิ่มสารอาหารที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ การใช้อัตราการเพิ่มสารอาหารที่คงที่ (Constant Rate Feeding) การเพิ่มสารอาหารแบบ Stepwise Feeding และการเติมแบบ Exponential Feeding เป็นต้น ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เพื่อให้การเพาะเลี้ยงแบบเติมหกะประสบความสำเร็จ

2. Two Stage Cyclic Fed-Batch Process

เป็นการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมหกะโดยการส่งถ่ายน้ำหมักในระยะที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโต (Growth Stage) ไปยังระยะที่เป็นการผลิต (Production Stage) แล้วเก็บ

ไว้เพียงบางส่วนให้ยังคงอยู่ในระยะของการเจริญเติบโตต่อไปจากนั้นจึงเติมอาหารที่เตรียมไว้ก่อนหน้าจนเต็มปริมาตรที่ต้องการใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการเติมที่เหมาะสม ในขณะที่ส่วนที่ย้ายออกไปเพื่อให้เข้าขั้นของการผลิตผลิตภัณฑ์ คือเหนี่ยวนำให้ยีนเกิดการแสดงออกและสร้างผลผลิตนั้น ต้องมีการปรับสภาวะ ทั้งในเรื่องของ pH อุณหภูมิ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรือสูตรอาหาร ซึ่งสามารถจะควบคุมให้เหมือนหรือแตกต่างจากในขั้นของการเจริญเติบโตอย่างไรก็ได้ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด

3. Temperature-Limited Fed-Batch (TLFB) Process

เป็นเทคนิคที่ควบคุมอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ด้วย Temperature Profile ที่ค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย มากกว่าที่จะควบคุมด้วย Feeding Profile ซึ่งมีสองกลไกที่ช่วยให้เทคนิคนี้สามารถมีการสะสมผลผลิตได้มากกว่า เนื่องจากเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis) น้อยลง เนื่องจาก การใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่ำ และเซลล์มีการตายน้อยและปล่อยเอนไซม์โปรติเอส (Protease) สู่อาหารเพาะเลี้ยงลดน้อยลง

4. A-Stat

เป็นเทคนิคที่มีการทำงานร่วมกันระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยอาศัยพื้นฐานการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ค่อย ๆ มีการเปลี่ยนแปลง (Smooth Change) ในช่วงแรกการเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะเหมือนกับ Chemostat คือเป็นการเพาะเลี้ยงในสภาวะคงที่ (Steady State) หลังจากนั้นคอมพิวเตอร์จะควบคุมอัตราการเจือจาง ให้มีการเปลี่ยนแปลงแบบค่อยเป็นค่อยไป ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของเวลายังคงมีการรักษาให้คงที่ เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ A- stat นี้แสดงให้เห็นว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาปริมาณของเซลล์ เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการบริโภคนสารตั้งต้นน้อยกว่า และเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่าเทคนิค Chemostat แบบดั้งเดิม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจะมีอัตราการเจือจางตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงแบบค่อยเป็นค่อยไปมากกว่าการเปลี่ยนแปลงแบบฉับพลัน

5. Dialysis Fermentation

การหมักแบบ Dialysis เป็นเทคนิคที่สามารถแก้ปัญหาในเรื่องการถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยอะซิเตรตและสารอาหารอื่น ๆ เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงได้ ซึ่ง Dialysis หมายถึงการแยกของโมเลกุลละลายน้ำต่าง ๆ โดยอาศัยการแพร่ที่ไม่เท่ากันของแต่ละโมเลกุลผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Semi-Permeable Membrane) ที่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความเข้มข้นของแต่ละโมเลกุล

6. Pressurized Cultivation

เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่มีการนำการเติมอากาศรวมกับการเพิ่มความดันภายในถังมาใช้ร่วมกัน เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ของเซลล์

แต่การเพิ่มความดันโดยให้อัตราการเติมอากาศคงที่ในการเพาะเลี้ยงนั้นทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้น เป็นผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่หากมีการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศตลอดระยะเวลาที่มีการเพิ่มความดันนั้น จะสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนการใช้การเติมแก๊สออกซิเจนบริสุทธิ์ได้ ซึ่งมีราคาแพง ไม่เหมาะกับการนำมาใช้งานจริง

7. Perfusion Techniques

ลักษณะพื้นฐานของเทคนิคนี้ คือความคงที่ในการเติมอาหาร เซลล์คงเหลือ (Retention Cell) และในบางครั้งอาจมีการคัดเลือกเซลล์ตายออกได้ เซลล์ที่เหลือมักจะได้มาจากการผ่านแผ่นเมมเบรน หรือจากการคัดแยก หรือได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ตายออก ซึ่งเทคนิคนี้ไม่นิยมนำมาใช้กับเซลล์จุลินทรีย์ แต่นิยมนำมาใช้กับเซลล์สัตว์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อหากมีการแบ่งประเภทตามองค์ประกอบภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทหลัก ๆ ดังนี้

1. Defined media หรือ Synthetic media

Defined media เป็นอาหารที่ทราบชนิดและปริมาณของสารอาหารภายในอย่างแน่นอน เนื่องจากใช้องค์ประกอบเป็นสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นอาหารชนิดนี้จึงมีราคาถูก รวมถึงไม่มีความแตกต่างในระหว่างการดำเนินการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งจึงง่ายต่อการดำเนินการเพาะเลี้ยงและการควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่ต้องการ ดังนั้นอาหารชนิดนี้จึงนิยมใช้เป็นอาหารในระดับอุตสาหกรรม

2. Complex media

Complex media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบชนิดและปริมาณขององค์ประกอบภายในอย่างแน่นอน เนื่องจากมีส่วนผสมที่ได้จากธรรมชาติ ทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ มาในรูปขององค์ประกอบที่ซับซ้อน เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และวิตามิน แร่ธาตุต่าง ๆ ทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่อย่างไรก็ตามอาหารชนิดนี้เหมาะสมกับการใช้ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เนื่องจากมีราคาแพง และฤดูกาลมีผลต่อองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ จึงทำให้มีความแปรปรวนเกิดขึ้นตามช่วงเวลา จึงยากต่อการควบคุมและการดำเนินการ

3. Semi defined media

Semi defined media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบหลักเป็น defined medium แต่มักมีการเสริมสารอาหารเสริมบางอย่างจากธรรมชาติร่วมด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสูตรอาหาร เช่น ยีสต์สกัด เปปโตน เป็นต้น

แหล่งคาร์บอน

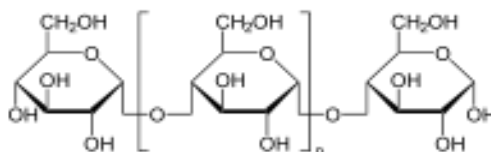
แหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในการสร้างพลังงาน และนำไปสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biosynthesis) เพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ และการบำรุงเซลล์ ในอาหารสำหรับการหมัก การเพาะเลี้ยงใส่แหล่งคาร์บอนลงไปเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีขายในทางการค้าและสามารถนำมาใช้ในการเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในการหมักได้เป็นอย่างดี และนิยมใช้มาก เช่น กลูโคส ซูโครส แม้จะสามารถใช้อื่นเป็นแหล่งคาร์บอนแทนได้

โดยทั่วไปแล้วโพลีแซคคาไรด์จะไม่สามารถถูกนำมาใช้งานได้ทันที หรือนำไปใช้ได้ยากไม่เหมือนกับโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ แต่ก็ยังสามารถที่จะถูกนำไปใช้ได้โดยตรงในจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ซึ่งส่วนมากเป็นจุลินทรีย์จำพวกเชื้อรา โดยจะปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์และย่อยให้กลายเป็นมอลโทส และกลูโคส ก่อนลำเลียงเข้าเซลล์

เดกซ์ตริน (Dextrin)

เดกซ์ตรินเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ถูกจัดเป็นแป้งดัดแปลง (modified Starch) ชนิดหนึ่ง มีสูตรโมเลกุล คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อผ่านการทำให้แห้งจะมีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีเหลือง เดกซ์ตรินได้จากการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ ซึ่งก็ได้แก่เอนไซม์ในกลุ่มของอะไมเลส คือ แอลฟา อะไมเลส (α -amylase) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีความสามารถในการย่อยโมเลกุลของแป้งที่มีกิ่งข้างให้กลายเป็นกลูโคส (glucose) ได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่มีความสามารถที่จะย่อย พันธะ 1, 6 ที่เป็นจุดเชื่อม จึงต้องมีการใช้เอนไซม์อีกตัวหนึ่ง คือ 1, 6 กลูโคซิเดส มาทำการย่อยต่อจึงจะได้เป็นกลูโคส หรือมอลโทส (maltose)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเดกซ์ตริน เป็นสารผสมระหว่างโพลีเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก 1, 4 หรือ 1, 6 ในจำนวนที่ไม่แน่นอน เดกซ์ตรินเป็นสารที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการการย่อยสลายแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ คือระหว่างขั้นตอนแรก โดยการใช้เอนไซม์แอลฟา อะไมเลสเข้าไปใช้ในการย่อยแป้ง จะได้เป็นเดกซ์ตรินที่มีขนาดโมเลกุลไม่แน่นอน ซึ่งส่วนมากเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ามอลโทส แต่เล็กกว่าโพลีแซคคาไรด์



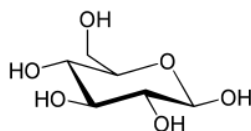
ภาพที่ 2-1 โครงสร้างโมเลกุล ของ เดกซ์ตริน (<http://en.wikipedia.org/wiki/Dextrin>)

จุลินทรีย์ส่วนมากจะไม่สามารถย่อยสลาย หรือนำเดกซ์ตรินไปใช้ในกระบวนการ เมตาโบไลต์ (metabolites) ต่าง ๆ ได้ ยกเว้นบางชนิดที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์จำพวก กลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถปล่อยเอนไซม์ดังกล่าวออกมาย่อยให้ได้เป็นกลูโคสแล้วจึงนำไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ได้

กลูโคส (glucose)

กลูโคสเป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_{12}O_6$ มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยกัน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และสารตัวกลาง (metabolic intermediate) กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular Respiration) โครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของมัน (D-glucose) จะอยู่ในรูปที่เรียกว่า เดกซ์โตรส (dextrose) กลูโคสยังมีความสำคัญสำหรับการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร

การผลิตกลูโคสนั้นเป็นกระบวนการที่ทำต่อจากการผลิตเดกซ์ตริน คือ นำเดกซ์ตรินมาตัดด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถตัดปลายกลูโคสจากสายเดกซ์ตรินที่ละโมเลกุล จนได้เฉพาะโมเลกุลของกลูโคส ที่สามารถนำมาใช้งานได้



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคส (<http://th.wikipedia.org/wiki/กลูโคส>)

จุลินทรีย์ต้นแบบ

1. *E. coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่สามารถอยู่ได้ทั้งแบบที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีลักษณะเป็นท่อนสั้น โดยทั่วไปแบคทีเรียชนิดนี้จะมีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ในการหมัก เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) และ กรดฟอร์มิก (formic acid) เป็นต้น

ข้อมูลที่น่าสนใจที่เกี่ยวข้องกับ *E. coli* ทั้งทางด้านชีวเคมี กายภาพ และพันธุศาสตร์ ได้มีการศึกษาและเก็บรวบรวมไว้มากมาย ซึ่งจากความรู้ข้างต้นและอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วของจุลินทรีย์ชนิดนี้ จึงทำให้กลายมาเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมมาก นอกจากนี้ยังได้รับความสนใจมากในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ต้นแบบโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับโพรคาริโอต ในการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล และยังได้รับการพิจารณาให้เป็นเจ้าบ้านในอุดมคติ (ideal host) ในการทดลองเกี่ยวกับการโคลนยีน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาถึงข้อมูลในทางด้านต่าง ๆ มาเป็นเวลานาน ว่ามีคุณลักษณะที่ดี ผลที่ตามมาในที่สุดก็คือ ได้รับการพัฒนาเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์ได้สูงสุด ในกระบวนการรีคอมบิแนนซ์สำหรับการผลิต เฮทเทอโรโลกัสโปรตีน และอื่น ๆ อีกมากมาย จากการใส่ยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาจาก *E. coli* นั้นมักเกิดปัญหา โดยเฉพาะความไม่เหมาะสมในการสร้างโปรตีนที่มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมาก

2. *S. cerevisiae*

ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในวิวัฒนาการของจุลชีววิทยา ชีวเคมี และ พันธุศาสตร์มาก โดยในระยะเวลา 25 ปีที่ผ่านมากลายเป็นแบบจำลองเซลล์ยูคาริโอต สำหรับการศึกษาหลายด้าน ได้แก่ ชีวเคมี ชีววิทยาของเซลล์ พันธุศาสตร์ และชีววิทยาระดับโมเลกุล *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีการใช้ประโยชน์มากที่สุด ตั้งแต่สมัยโบราณในการทำขนมปังและเบียร์ เซลล์ของ *S. cerevisiae* เป็นรูปทรงรีคล้ายไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ เจริญแบบอาศัยออกซิเจนและไม่อาศัยออกซิเจน (facultative anaerobic) โดยทั่วไปจำเป็นต้องใช้สารอาหารได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ทั้งอนินทรีย์และอินทรีย์ ไนโตรเจน รวมไปถึงต้องมี แหล่งวิตามิน เช่น ไบโอติน เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยง (Mimage, 2006)

S. cerevisiae เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับให้เป็นต้นแบบสำหรับ ยูคาริโอต ด้วยหลายเหตุผล ดังที่ สาวิตรี ลิ้มทอง (2549) ได้กล่าวไว้ ดังนี้

เหตุผลทางด้านประวัติศาสตร์

1. เซลล์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเซลล์นั้นเป็นที่ยอมรับในสาธารณะ
2. เป็นยีสต์อุตสาหกรรมที่ไม่เป็นเชื้อโรค
3. เป็นยูคาริโอตที่ไม่ซับซ้อน และมีการศึกษามากที่สุดทางด้านชีวเคมีและพันธุศาสตร์

เหตุผลทางด้านเทคโนโลยี

1. การเจริญของยีสต์ในปริมาณมาก ๆ ทำได้ง่ายและปลอดภัย
2. เทคโนโลยีการหมักและการแยกผลิตภัณฑ์ของยีสต์สามารถเข้าใจและพัฒนาได้ง่าย
3. เทคโนโลยีการขยายขนาดจากระดับงานวิจัยจึงถึงการผลิตค่อนข้างตรงไปตรงมา
4. แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ทันทีมีราคาไม่แพง และมีหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการเจริญของเซลล์และในการหมักได้
5. ผลิตขึ้นจากแหล่งอื่น ๆ ได้ในระดับสูง ทั้งที่สะสมไว้ภายในเซลล์และหลังออกสู่ภายนอก

เซลล์

เหตุผลทางพันธุศาสตร์

1. เป็นยูคาริโอต และมีความสามารถในการแสดงออกของยีนจากยูคาริโอตชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. มีความสามารถในการปรับตัวได้อย่างดี เพื่อให้ผลผลิตจากผลิตภัณฑ์เมแทบอลิซึมสูง นอกจากนั้นยังทนทานดีในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และมีความกดดันสูง
3. จีโนมค่อนข้างเล็ก และสามารถดัดแปลงโดยการนำสมพันธุแบบดั้งเดิมและการใช้เทคนิคสมัยใหม่ คือ รีคอมบิแนนซ์ ดีเอ็นเอ
4. สามารถสร้างสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตสูง
5. รู้ว่าโคดอนที่เลือกใช้คืออะไร
6. มีเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกสำหรับสายพันธุ์ที่มีโครโมโซมหลายชุด
7. มีพลาสมิด เช่น 2 ไมโครเมตร ดีเอ็นเอ แต่ไม่มีไวรัสสำหรับฆ่าเซลล์

เหตุผลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

1. การทรานสฟอร์มเมชันเป็นไปได้ทั้งโดยใช้พาหะชนิดถ่ายแบบด้วยตัวเองและพาหะชนิดรวมตัว
2. มีกลไกการดัดแปลงหลังการถ่ายแบบ ซึ่งหมายถึงการไกลโคซิเลชันเกิดร่วมกับ Proteolytic Maturation Particle Assembly
3. การหลังโปรตีนค่อนข้างมีประสิทธิภาพและควบคุมได้โดยลำดับสัญญาณภายใน
4. สามารถตัดแยกอินทรอนออกจากยีนส์ตัวได้

5. อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสของยีสต์จดจำโปรโมเตอร์ของยีนสัตว์หลายชนิด ดังนั้นรีคอมบิแนนซ์ ดีเอ็นเอเทคโนโลยี จึงเรียกว่าเป็น Idal Host

ประโยชน์จากยีสต์

1. มีศักยภาพใช้เป็นแหล่งของโปรตีนเนื่องจากมีโปรตีนเฉลี่ย 46.4-58.3 เปอร์เซ็นต์รวมไปถึงมีกรดอะมิโนจำเป็นครบอีกด้วย ยิ่งกว่านั้นยังประกอบด้วยธาตุหลายชนิดที่คนและสัตว์ต้องการปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดินัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิด โดยเฉพาะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบีรวม และยังมีวิตามินดี และวิตามินอี และใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมหรือเพิ่มกลิ่นรสของอาหารคนและสัตว์มาเป็นเวลานาน

2. มีความสามารถในการนำมาใช้ผลิต รีคอมบิแนนซ์โปรตีน ซึ่งได้รับการยอมรับให้เป็นต้นแบบของยูคาริโอติกเซลล์ สามารถที่จะผลิตโปรตีนสัตว์ รวมถึงโปรตีนมนุษย์ได้หลายชนิด เช่น อินเทอเฟอรอน ซีรัมอัลบูมิน วัคซีน และอื่น ๆ มากมาย เนื่องจากมีความเป็นยูคาริโอตเช่นเดียวกัน (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

3. มีศักยภาพในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด เนื่องจากมีความสามารถในการทนแอลกอฮอล์ได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Rose, 1993) ซึ่งระดับที่ทนได้แตกต่างกันนั้นเป็นการบ่งบอกถึงความสามารถในการปรับตัวเพื่อผลิตเอทานอลได้แตกต่างกัน (Chi & Arneborg , 2000) ยกตัวอย่างเช่น

4. การผลิตยีสต์ขนมปัง
5. การผลิตเอนไซม์ ใช้ในการผลิตเอนไซม์อินเวทอส

3. A. oryzae

A. oryzae เป็นเชื้อราที่ได้รับการยอมรับ และมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางมากที่สุดในบรรดาเชื้อราด้วยกัน เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางด้านการค้าและอุตสาหกรรมได้หลากหลายชนิด เช่น แอลฟา อะไมเลส กลูโคสอะไมเลส และโปรติเอสเป็นต้น และสามารถปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้ในปริมาณมาก

นอกจากนี้ยังได้รับความสนใจในการเป็นเซลล์เจ้าบ้านในเทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลและการโคลนยีน ทั้งในส่วนของโปรตีนเชื้อราเอง หรือแม้กระทั่งโปรตีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีในขั้นตอนของ post translation และสามารถปล่อยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ได้

สรุปทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวคิดของการวิจัย

การใช้โอลิโกเมอร์ของน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสามารถช่วยลดการเกิดปัญหา Crab-Tree effect โดยการเพาะเลี้ยงแบบปกติทั่วไป การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์จุลินทรีย์ได้ เนื่องจากการคั่งของกลูโคสที่ถูกกล้ำเลี้ยงเข้าเซลล์ ทำให้ออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับการสลายกลูโคสให้ได้พลังงาน จึงเป็นเหตุให้กลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น ๆ เช่น แอลกอฮอล์ หรืออะซิเตท ที่เป็นพิษต่อ จุลินทรีย์ ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการใช้โอลิโกเมอร์ของน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีสายยาวพอสมควร จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่ต้องค่อย ๆ ย่อยก่อนการกล้ำเลี้ยงเข้าเซลล์และนำไปใช้ จึงไม่เกิดการสะสมของกลูโคสในเซลล์ที่ปริมาณสูง เซลล์จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดี รวมถึงปริมาณผลิตภัณฑ์ของเซลล์สูงด้วย แม้จะทำการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch) แบบให้อากาศ (aerobic cultivation) ด้วยวัตถุดิบที่เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงมากถึง 10-15 % (100-150 กรัม/ลิตร) น้ำหนักโดยปริมาตรก็ตาม (ซึ่งปกติถ้าใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไม่สามารถทำได้ และปกติโดยทั่วไปจะใช้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 30 กรัม/ลิตร)

แนวคิด

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 3 ชนิดในอาหารประเภท defined medium สูตรเดียวกัน โดยการใช้โอลิโกเมอร์ของน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ รวมถึงมีการพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะต่อเนื่อง (sequential batch) สามารถทำได้เซลล์ความเข้มข้นสูงได้ (High cell density) ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ของเซลล์ในปริมาณสูง

ศักยภาพ

การเพาะเลี้ยงแบบกะต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงที่มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพชนิดต่าง ๆ เนื่องจากมีความซับซ้อนของกระบวนการดำเนินการน้อย รวมถึงการใช้โอลิโกเมอร์ของน้ำตาลจะช่วยลดต้นทุน และเวลาในการผลิต เนื่องจากมีขั้นตอนในการผลิตที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้กลูโคส

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และ เศรษฐวิชัย ฉ่ำศาสตร์ (2557) จากการวิจัยเบื้องต้น เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ 2 ชนิดให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ด้วยอาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) โดยใช้โอลิโกเมอร์ของกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ทริน) ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะไปสู่เทคนิคแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่องแบบเข้มงวดที่มีศักยภาพสูงกว่า เพื่อให้สามารถขยายขนาดในระดับอุตสาหกรรมได้ ทั้งนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคดังกล่าว 3 ครั้งต่อเนื่องกัน ทำให้มีอัตราผลิตเซลล์ *E. coli* ได้ถึง 2.88 g/L/h โดยใช้เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 100 g/L และมีอัตราการผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* เท่ากับ 1.06 g/L/h ด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 60 g/L ซึ่งโดยรวมพบว่ามีประสิทธิภาพเทียบเคียงได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (fed-batch cultivation) ซึ่งเทียบเท่าได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเติมของ Lee & Chang (1993) ที่มีอัตราการผลิตมวลเซลล์ *E. coli* ได้ 2.92 g/L/h ที่มีวิธีการที่ยุงยากมากกว่า

จุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลูโคส โดย *E. coli* และ *S. cerevisiae* สามารถใช้ได้มากถึง 100 และ 60 g/L ตามลำดับ ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในขณะที่ Riesenber & Guthke (1991) และ Shiloach & Fass (2005) รายงานว่าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุดเพียง 50 และ 30 g/L ตามลำดับ

Liu *et al.* (2000) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่มียีน pGL-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการรีคอมบิแนนซ์ให้สามารถสร้าง Penicillin G Acylase (PGA) ให้มีการเจริญเติบโตแบบเซลล์ความเข้มข้นสูง โดยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ด้วยเทคนิคการใช้ออกซิเจนบริสุทธิ์ ใช้น้ำตาล และ ซอลบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมความดัน การกวนผสม และการเติมแก๊สออกซิเจนบริสุทธิ์แทนการใช้อากาศทั่วไป ซึ่งทำให้สามารถได้เซลล์ความเข้มข้นสูงมากถึง 164 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

Fuchs *et al.* (2002) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่ผ่านกระบวนการรีคอมบิแนนซ์ด้วย Dialysis Fermenter ทั้งระดับห้องปฏิบัติการ (2 ลิตร) และระดับโรงงานต้นแบบ (300 ลิตร) โดยมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุนใบพัด 200-750 รอบต่อนาที ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นมากถึง 190 กรัม/น้ำหนักรวมเซลล์แห้งต่อลิตร

Raj *et al.* (2002) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* แบบเติมกะที่ใช้กลีเซอรอล เป็นสารตั้งต้น โดยใช้กลวิธีในการเติมสารอาหารคือ การวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของ ค่าพีเอชแบบ On Line หากค่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากค่าที่กำหนดไว้ คือ 5.0 ± 0.1 ระบบก็จะทำการเติมกลูโคสและ แอมโมเนียม ฟอสเฟตลงไป โดยอัตโนมัติ ซึ่งการที่ค่าพีเอชมีค่าสูงนั้นเกิดจากการที่เซลล์มีการ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการปล่อยโปรตรอนลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้พีเอชมีค่าน้อยลงจาก ที่ตั้งไว้ ในการทดลองในครั้งนี้พบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นมากถึง 140 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ภายใต้การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 16 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน ที่ 400-700 รอบต่อนาที ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในให้คงที่ที่ 75-90 เปอร์เซ็นต์ โดยในช่วง แรกมีการเติมอากาศโดยใช้อากาศที่ 0.1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่ออนาที และเปลี่ยนเป็น การเติมด้วยแก๊สออกซิเจนที่ 0.5 ปริมาตรออกซิเจนต่อปริมาตรอาหารต่ออนาที เมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโต

Kim (2004) พัฒนากลยุทธ์การเติมสารอาหาร ในการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยทำการ เติมสารอาหารร่วมกับ เทคนิค pH-stat ซึ่งเป็นหนึ่งในการควบคุมแบบย้อนกลับ (Simple Indirect Feedback Method) เทคนิคนี้สามารถช่วยลดการเกิดปัญหาการสะสมของสารตั้งต้นที่มากเกินไปใน อาหารเพาะเลี้ยง โดยเมื่อกลูโคสหมด ค่า pH จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ระบบก็จะทำการเติมกลูโคสลง ไป แต่เมื่อกลูโคสเพิ่มมากขึ้นจนถึงค่าที่กำหนดไว้ระบบจึงจะหยุดการเติม สภาวะในการทดลองคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช ควบคุมให้อยู่ที่ 6.8 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ อัตราการกวนให้อากาศที่ 900 รอบต่อนาที ซึ่งในการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคนี้สามารถผลิตเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ที่ตัดต่อพันธุกรรมได้ความเข้มข้นมากถึง 101 น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

Faulkner *et al.* (2006) ได้มีการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง ของ *E. coli* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยพัฒนา Feeding Profile ให้รักษาปริมาณของแหล่ง คาร์บอนในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่สามารถจำกัดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ คือให้มีอัตราการ เจริญ (Growth Rate) ต่ำกว่าอัตราการเจริญวิกฤติ (Critical Growth Rate) เพื่อให้เซลล์เกิดการ สร้างอะซิเตรตขึ้นมา จากนั้นทำให้อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารอีกครั้งเพื่อเป็นการเหนี่ยวนำ ให้เซลล์เกิดการดูดซับอะซิเตรต ที่สร้างขึ้นมาเองในช่วงแรก ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าความ เข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคนี้มีค่าเป็น 53 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 อัตราการกวนอยู่ ในช่วงระหว่าง 236 ถึง 1000 รอบต่อนาที

Matsui *et al.* (2006) ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง แบบเติมกะที่มีการเพิ่มความดันในถังหมัก ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าเดิม โดยมีการเพิ่มความดันในถังหมักควบคู่กับการควบคุมให้ระยะทางในการแทรกตัวของอากาศในของเหลวคั่งที่ โดยใช้อากาศธรรมดา แทนการใช้ออกซิเจนบริสุทธิ์ ซึ่งมีราคาแพง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 6-6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสผงเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งวิธีการนี้สามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นมากถึง 130 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และเมื่อลองใช้ในการเพาะเลี้ยงกับ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม ก็สามารถได้เซลล์ความเข้มข้นมากถึง 102 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคการเพิ่มความดันโดยการควบคุมให้อัตราการเติมอากาศคงที่นั้นไม่สามารถช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตแบบเซลล์ความเข้มข้นสูงได้

Kim *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* เพื่อผลิตเบตา- กลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบมากในผนังเซลล์ของยีสต์ โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep Liquor) และเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบเติมกะ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบเติมกะ โดยใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น สามารถผลิตเซลล์ได้สูงที่สุดมากถึง 95.7 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายกากน้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์ เติมนลงในถังหมักที่อัตราการเติม 10 มิลลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเซลล์ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมากถึง 2.4 เท่า

Shakeri, *et al.*, (2007) ทดสอบการผลิต dye-decolorizing (rDyP) ด้วย *A. oryzae* ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม โดยการใช้ผง wheat brain และ rice brain ในการหมักแบบ Repeated-batch เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch ซึ่งพบว่ามีความเฉลี่ยผลผลิต rDyP เทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ และมีปริมาณสูงกว่ารายงานการผลิตที่ผ่านมา

Wang *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิตกลูตาไธโอน (Glutathione) จาก *S. cerevisiae* โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่ควบคุมการเติมสารอาหารแบบการควบคุมย้อนกลับ คือมีการควบคุมการเติมปริมาณกลูโคสตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการหายใจของเซลล์ โดยมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 180 รอบต่อนาที พีเอช 5.2 ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้มากถึง 140 กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 52 ชั่วโมง แต่เมื่อทดลองเติมกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื่อพบว่าสามารถให้

ผลผลิต Glutathione เพิ่มมากขึ้น และช่วยทำให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นลง หรือเพียงแค่ 38 ชั่วโมงเท่านั้น เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงอื่นที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน

Matsui *et al.* (2008) ได้มีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *E. coli* ให้ผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงได้ โดยปรับปรุงสูตรอาหารจากสูตร TK-25 ให้เป็น TK-10 ซึ่งพบว่าเมื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีสภาวะเหมาะสม คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาทีด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ที่รักษาความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในช่วง 1-40 กรัมต่อลิตรตลอดระยะเวลาการทดลองพบว่า ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงมากถึง 65 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 14 ชั่วโมง

Biener *et al.* (2010) ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยมีการประยุกต์นำเอาเทคนิค Calorimetric มาใช้ คือควบคุมอัตราเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จากการวัดการส่งถ่ายความร้อน (Heat Transfer) ที่เซลล์สร้างขึ้นมาในระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาสมดุลของระดับความร้อน (Heat Balance) ของการเพาะเลี้ยงได้ และการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้จะทำการปรับอัตราการเติมสารอาหาร โดยการติดตั้งตัวควบคุม เพื่อควบคุมให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ในระดับที่ตั้งไว้ ซึ่งพบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุดถึง 120 กรัมต่อลิตร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบที่ใช้ในการวิจัย

1.1 ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสามชนิด ที่เก็บรักษาในหลอดวุ้นเยือกของอาหารมาตรฐานเฉพาะของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด ประมาณ 2-3 โคลนนี้ ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อแต่ละชนิดชนิด คือ NA สำหรับ *E. coli*, YPD สำหรับ *S. cerevisiae* และ PDA สำหรับ *A. oryzae* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในบัพเฟลพลาสท์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ตาม pH อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด คือ *E. coli* ที่ pH 6.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ pH 4.5-5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และ รา *A. oryzae* ที่ pH 5.5 -6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

1.2 น้ำหมักที่ได้ ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการทดลองต่อไปทั้งหมด โดยใช้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง BMP (Batch Production Medium)

2. การศึกษาประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบในระดับฟลาสก์

เป็นการทดสอบซ้ำเพื่อความแม่นยำ โดยการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เดกซ์ตรินในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ โดยเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยใช้ เดกซ์ตรินซ์ และ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนของสูตรอาหาร BPM โดยอาหาร BMP สูตรปกติสำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นเดกซ์ตรินที่เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งสำปะหลัง 1 เท่า คือ 25-30 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.2 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 1.5 กรัม/ลิตร Na_2HPO_4 1.8 กรัม/ลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม/ลิตร และ Trace Element Solution 1 มิลลิลิตร/ลิตร

2.1 เตรียมอาหารสูตร BPM โดยแทนที่แหล่งคาร์บอน ในสูตรอาหารด้วย เดกซ์ตรินซ์ และ กลูโคส ที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปปรับค่า pH ให้เหมาะสมตามสภาวะการเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์ต้นแบบแต่ละชนิด ใส่ลงในบัพเฟลพลาสท์ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร เตรียมอย่างละ 4 ฟลาสก์ จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สำหรับการเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อและเติมเดกซ์ตรินที่เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลแล้ว จะต้องเติมเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสลงไปด้วยที่ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตรของ

เอนไซม์/ต่อน้ำหนักของเดกซ์ทรินที่คิดเป็นน้ำหนักแห้ง (dry solid) เนื่องจากยีสต์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยเดกซ์ทรินโอลิโกเมอร์ได้

2.2 ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้นแบบ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร BPM

2.3 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ตาม pH อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ต้นแบบคือ *E. coli* ที่ pH 6.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ pH 4.5-5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และ รา *A. oryzae* ที่ pH 5.5 -6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง (สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ รวมทั้งแหล่งไนโตรเจน และ trace element solution ทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษาล่วงหน้ามาก่อนแล้ว)

2.4 เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อครั้ง (ตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่บอกไว้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงข้างต้น) ใส่ลงในขวดฝาเกลียว แช่เย็นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความขุ่น ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และน้ำหนักเซลล์แห้ง พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

เพิ่มเติม การทดลองที่ระดับฟลาสก์เขย่านี้อาจมีการทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเติมสารอาหารเสริมบางอย่างเพื่อเร่งการเจริญของจุลินทรีย์

3. การศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มข้น”

การศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มข้น” เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของผลผลิตมวลเซลล์ (productivity) ที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะมาตรฐาน (standard fed-batch technique) ด้วยเทคนิคที่ง่ายกว่าและมีประสิทธิภาพมากกว่า

3.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสามชนิด แต่ละชนิดในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นสูงสุดที่เหมาะสมของการใช้เดกซ์ทรินที่เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคส เพื่อการศึกษาและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกะไปสู่เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มข้น โดยการใช้สภาวะสำหรับการเพาะเลี้ยง 4 อย่าง ที่เข้มข้น (intensive) คือ (1) ความเข้มข้นของสารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสูตร BPM (ตั้งในหัวข้อที่ 2 ข้างบน) (2) ความเข้มข้นของเดกซ์ทรินที่เป็นโอลิโกเมอร์ (3) อัตราการกวนผสม (agitation rates) และ (4) อัตราการให้อากาศ (aeration rates) (ดังตารางข้างล่าง) การออกแบบการทดลองอาศัยหลักมวลสารสัมพันธ์ (stoichiometry) การใช้วัตถุดิบ (dextrin substrate) การใช้อากาศ และการกวนผสม

(mixing) ซึ่งมีผลต่อการถ่ายโอนมวลสาร สัมพันธ์กับการผลิตมวลเซลล์ ทั้งหมดทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ

วิธีการ

- เตรียมอาหารสูตร BPM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่จะมีการเติมเดกซ์ตรินโพลิโกเมอร์ดังตารางข้างบน เป็นปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร เติมนลงในถังหมัก (แยกสารละลายเดกซ์ตรินโพลิโกเมอร์ เพื่อฆ่าเชื้อต่างหากเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที)
- ทำการเทียบค่า sensors วัดค่าต่าง ๆ ของถังหมัก ได้แก่ pH, และการละลายของออกซิเจน
- นำถังหมักฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- รอจนอุณหภูมิเย็นลง ประกอบและติดตั้งถังหมักเข้ากับชุดควบคุมและหัววัดต่าง ๆ ต่าง ตั้งค่า set points สำหรับอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง อัตราการกวนผสม และอัตราการเติมอากาศ ตามที่ต้องการ
- เติมเดกซ์ตรินโพลิโกเมอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในถังหมัก
- เมื่อค่าต่าง ๆ ถึงที่ค่า set points ทำการเติมหัวเชื้อตามหัวข้อ 1 ปริมาตรรวม 150 มล. ลงสู่ถังหมัก
- ทำการควบคุมระบบการเพาะเลี้ยงตามที่ตั้งค่าไว้ และเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มล. มาวิเคราะห์ผล นับตั้งแต่วันที่ T_0 คือ หลังจากการเติมหัวเชื้อ และ ทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 16 ชั่วโมง สำหรับ แบคทีเรีย *E. coli* ทุก ๆ 4 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* และ ทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 72 ชั่วโมง สำหรับรา *A. oryzae*
- นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปเก็บไว้ที่ -20°C ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ผลตามข้อ 5 ข้างล่างต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสามชนิด แต่ละชนิดในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นสูงสุด ที่เหมาะสมของการใช้เดกซ์ตริน (เลือกสภาวะที่เหมาะสมและให้ผลดีที่สุดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในข้อ 3.1) แล้วพัฒนาการเพาะเลี้ยงแบบกะไปสู่การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงแบบหลายกะต่อเนื่อง ทำเหมือนกับข้อ 3.1 ข้างบน โดยทำซ้ำกันอย่างต่อเนื่อง (โดยปราศจากการเริ่มต้นระบบใหม่) อย่างน้อย 3 ครั้ง แต่สูงสุดไม่เกิน 7 ครั้ง โดยทำต่อจากเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการของแต่ละกะ ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการดังต่อไปนี้

- ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะดั่งหัวข้อที่ 3.1จนถึงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เชื่อมีค่าการเจริญสูงสุดและก่อนที่เชื้อจะลดจำนวนลง
- ถายน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงออกจนเหลือปริมาตร 150 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในกะต่อไป
- ขณะทำการเพาะเลี้ยงกะแรก ทำการเตรียมอาหารสูตรเดิมใหม่อีกครั้งปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร (แยกสารละลายเดกซ์ตรินต่างหาก) แล้วนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อเตรียมเติมลงในถังหมักอีกครั้งหลังจากนำน้ำหมักออกจากถังเพาะเลี้ยงให้เหลือเพียง 150 มิลลิลิตร
- หลังจากเติมอาหารใหม่และเดกซ์ตรินลงไป ทำการเพาะเลี้ยงและควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ เหมือนกับสภาวะที่ดีที่สุดของกะแรก ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดสำหรับการวิเคราะห์ผลต่อไป
- ทำซ้ำกันอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 กะ (batches) อย่างมากที่สุดไม่เกิน 7 กะ

4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 วิเคราะห์และติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้ง ๓ ชนิด โดยวิธีการ

4.1.1 วิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) โดย นำตัวอย่างน้ำหมัก (ในกรณีที่มีความเข้มข้นมากเกินไป ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ให้มีค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550-600 นาโนเมตร โดยการใช้ น้ำกลั่นเป็น blank

4.1.2 วิเคราะห์มวลเซลล์ด้วยวิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว (ค่าน้ำหนักหลอดเปล่า) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

4.1.3 วิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทั้งสามชนิด โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ต่อช่วงเวลา หรืออัตราการเจริญ (growth rate) (productivity มีหน่วยเป็น $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ)

4.2 การวิเคราะห์และติดตามการใช้วัตถุดิบเดกซ์ตรินที่เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

4.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS (Miller, 1999) โดย นำ ตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแล้ว มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS (3,5 dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นต่ออีก 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นพาราฟิน เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลคงเหลือโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

4.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก (ดัดแปลงจากฉวีวรรณ สว่างวัน, 2548) โดยการเตรียมตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 16 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงถ่ายลงหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปรับให้มีค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7.0) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 นอร์มอล

ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อนำตะกอนต่าง ๆ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายออก เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำมาทำการวัดปริมาณน้ำตาล ด้วยวิธี DNS ดังข้างบน

4.2.3 วิเคราะห์ปริมาณการย่อยสลายเดกตริน โดยการวิเคราะห์ขนาดของโมเลกุล เดกซ์ตรินที่สั้นลงโดยการใช้ HPLC ที่สามารถหาความเข้มข้นของปริมาณเดกตริน และน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงเนื่องมาจากผลของการย่อยเดกตริน ได้แก่ น้ำตาล กลูโคส (DP1) มอลโตส (DP2) ไตรโอส (DP3) เตท-ตราโอส (DP4)... เดกตริน วิธีการนี้จะพิสูจน์ให้เห็นได้ว่า เดกตรินมีขนาดโมเลกุลค่อย ๆ สั้นลงเนื่องจากการค่อย ๆ ท่อย่อยโดยเอนไซม์ และทยอยลำเลียงหายเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยอาศัยหลักการคำนวณสมมูลมวลสารโดยการใช้ข้อมูลจากหัวข้อ 5.2.1, 5.2.2. และ 5.2.3 (วิธีการนี้ทางทีมงานผู้วิจัยได้ทดลองทำมาบางส่วนแล้ว ซึ่งได้ผลตามที่ตั้งสมมติฐานไว้)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

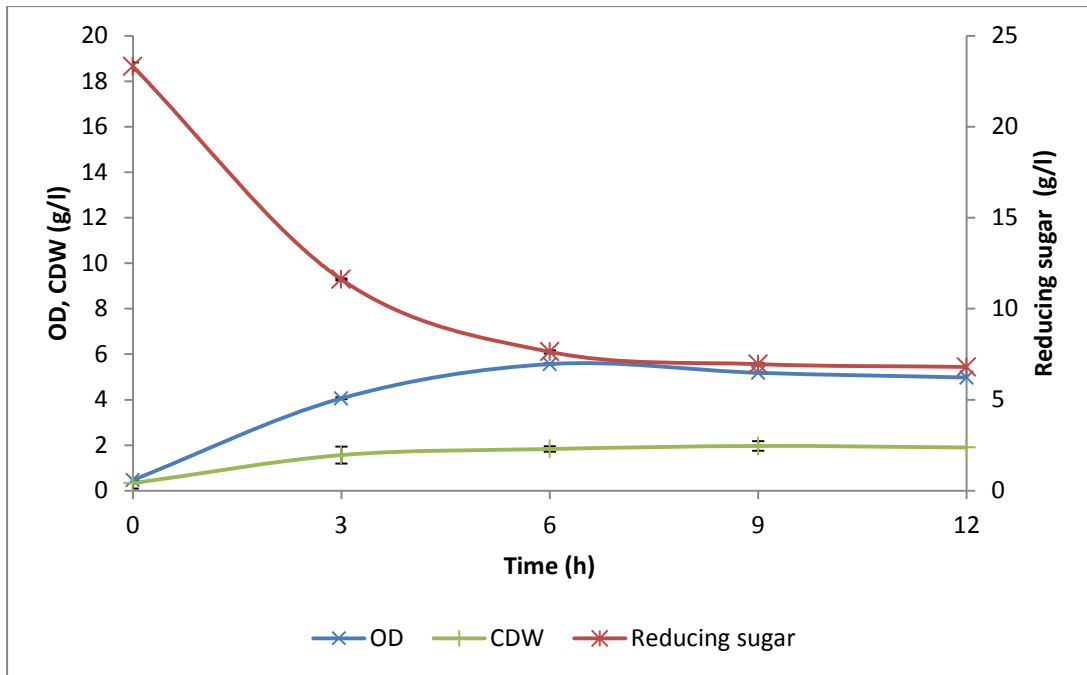
1. ผลการศึกษาการศึกษาประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบในระดับฟลasks

1.1 *E. coli*

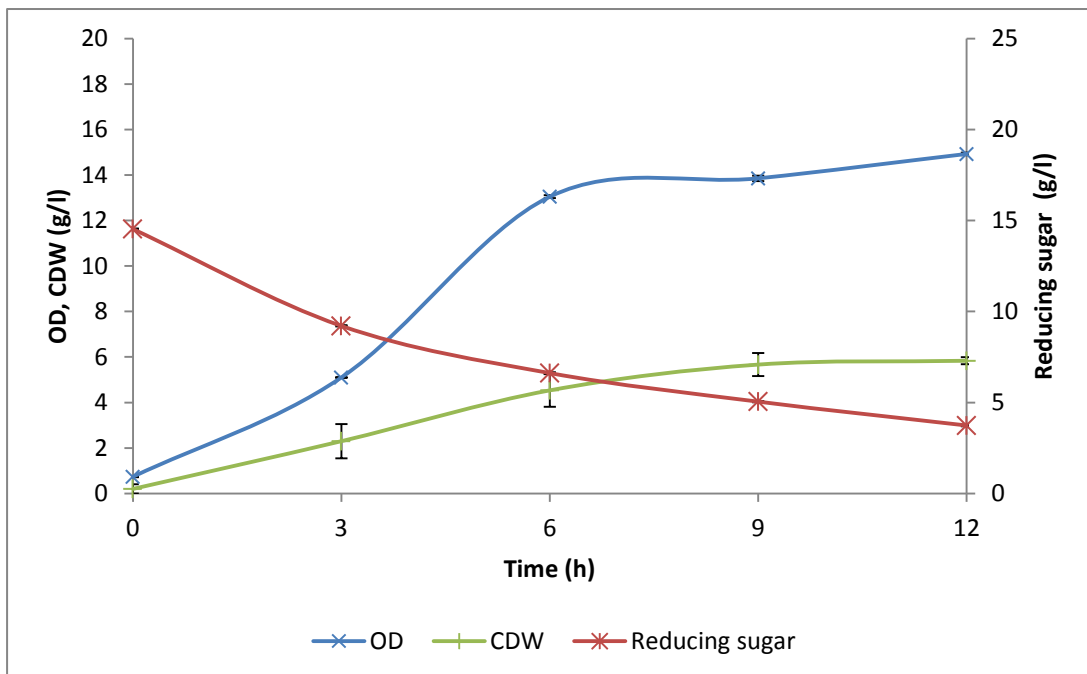
จากการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันระหว่างโพลิโกเมอร์ของน้ำตาล (เดกซ์ทริน) และกลูโคส ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในบัฟเฟิลฟลask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง พบว่า

จากภาพที่ 4-1 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *E. coli* ในสูตรอาหาร BPM ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *E. coli* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นมีแนวโน้มคงที่ จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่น เท่ากับ 5.83 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่า ช่วง 0-6 ชั่วโมงแรก ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ถึงชั่วโมงสุดท้าย มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตร

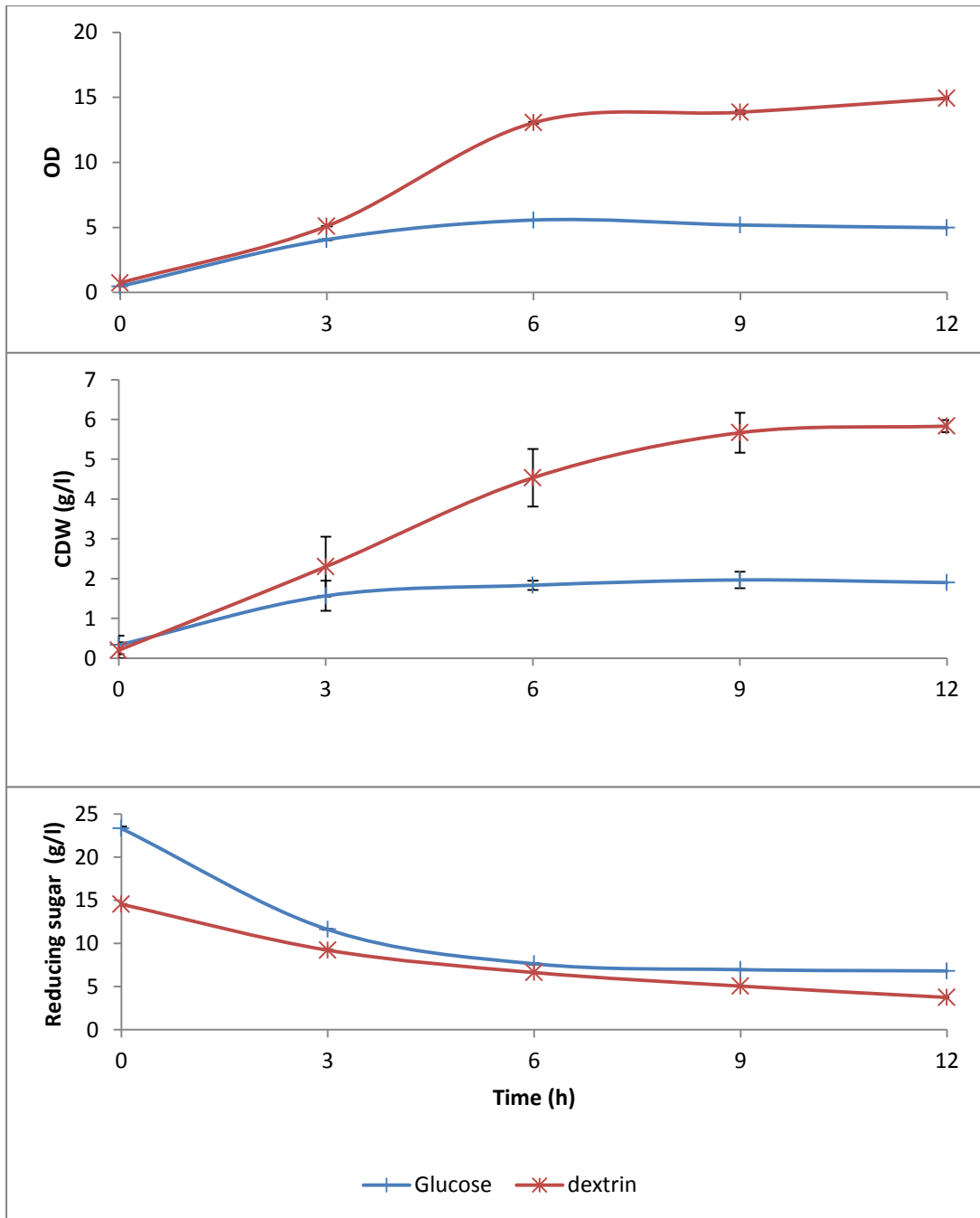
จากภาพที่ 4-2 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *E. coli* ในอาหารสูตร BPM ที่ใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *E. coli* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นการเจริญคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 12 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.83 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นเท่ากับ 14.93 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกลูโคส พบว่า ช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง ที่มีการเติมเดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเพาะเลี้ยง แต่สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้เพียง 10.76 กรัมต่อลิตรเท่านั้น และมีปริมาณที่ลดน้อยลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ในชั่วโมงสุดท้ายมีปริมาณกลูโคสคงเหลือที่วัดได้เท่ากับ 3.74 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-1 การเพาะเลี้ยง *E. coli* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4-2 การเพาะเลี้ยง *E. coli* โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4-3 เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยง *E. coli* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ กลูโคส และเดกซ์ทรีน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

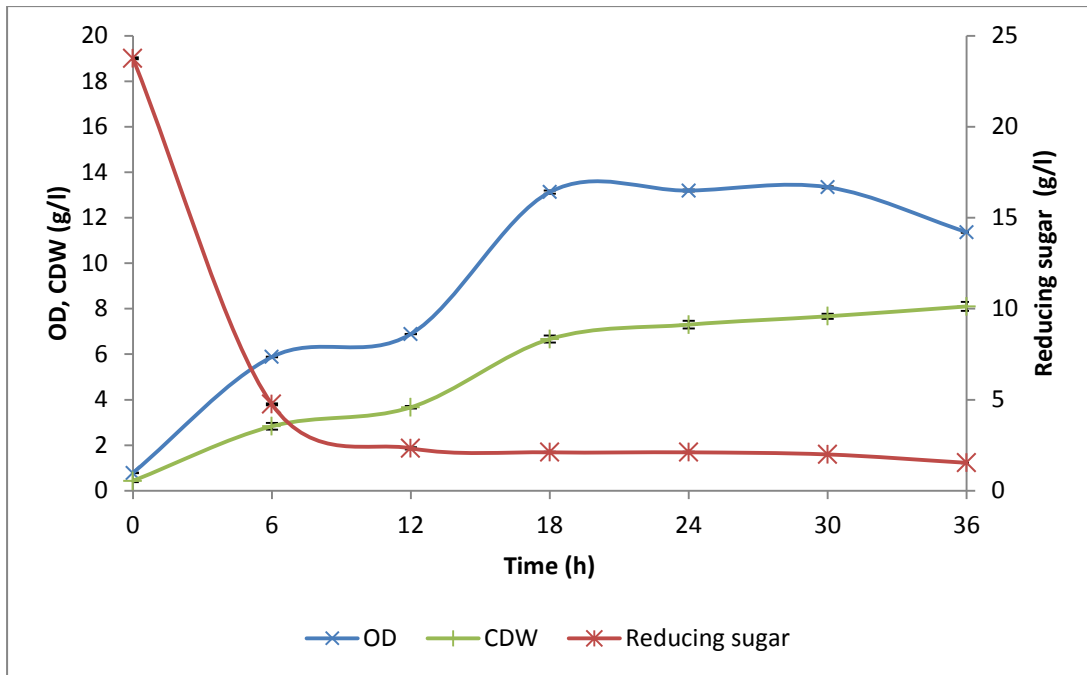
จากการศึกษาการเจริญของ *E. coli* ในสูตรอาหาร BPM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ เดกซ์ทรีน และกลูโคส พบว่า แนวโน้มการเจริญของ *E. coli* จากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิด มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ การเจริญเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ในชั่วโมงที่ 12 แต่ถึงแม้ว่าจะมีทิศทางเดียวกัน แต่ปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือการใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณเซลล์ *E. coli* สูงกว่า โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.83 กรัมต่อลิตร มีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนี้เป็นไปอย่างช้า ๆ ในระหว่างเพาะเลี้ยง ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร โดยมีการใช้กลูโคสอย่างรวดเร็วในช่วง 0-3 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *E. coli* ทั้งนี้เนื่องจาก เดกซ์ทรีน เป็นเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ดังนั้นจึงมีต้นทุนและขั้นตอนการผลิตที่น้อยกว่า ดังนั้นเหมาะสมจะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* การทดลองต่าง ๆ ต่อจากนี้จะเลือกใช้สูตรอาหาร BPM ที่มีเดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง

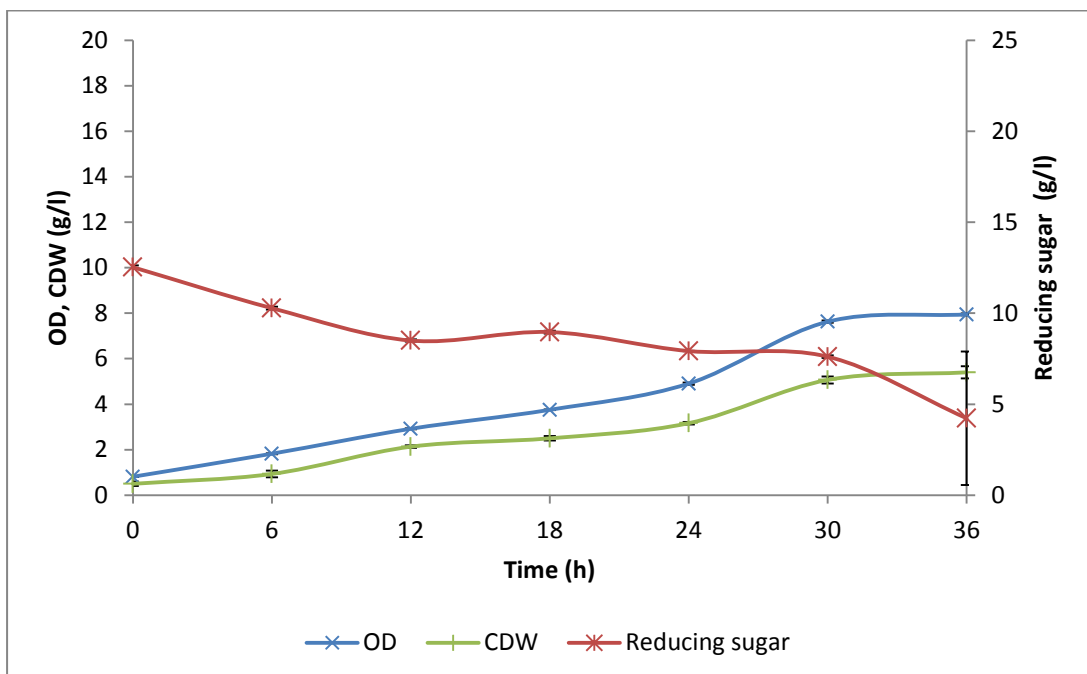
1.2 *S. cerevisiae*

จากการศึกษาการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของ *S. cerevisiae* โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนกับการใช้กลูโคส ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ในอาหารสูตร BPM ปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ในบัพเฟิลพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อ *S. cerevisiae* คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-4 - 4-6

จากภาพที่ 4-4 แสดงผลการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อพิจารณารูปการเจริญพบว่า มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 36 โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.20 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 12.60 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสพบว่า มีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นแนวโน้มการลดลงเข้าสู่ระยะคงที่ เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 1.53 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-4 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)

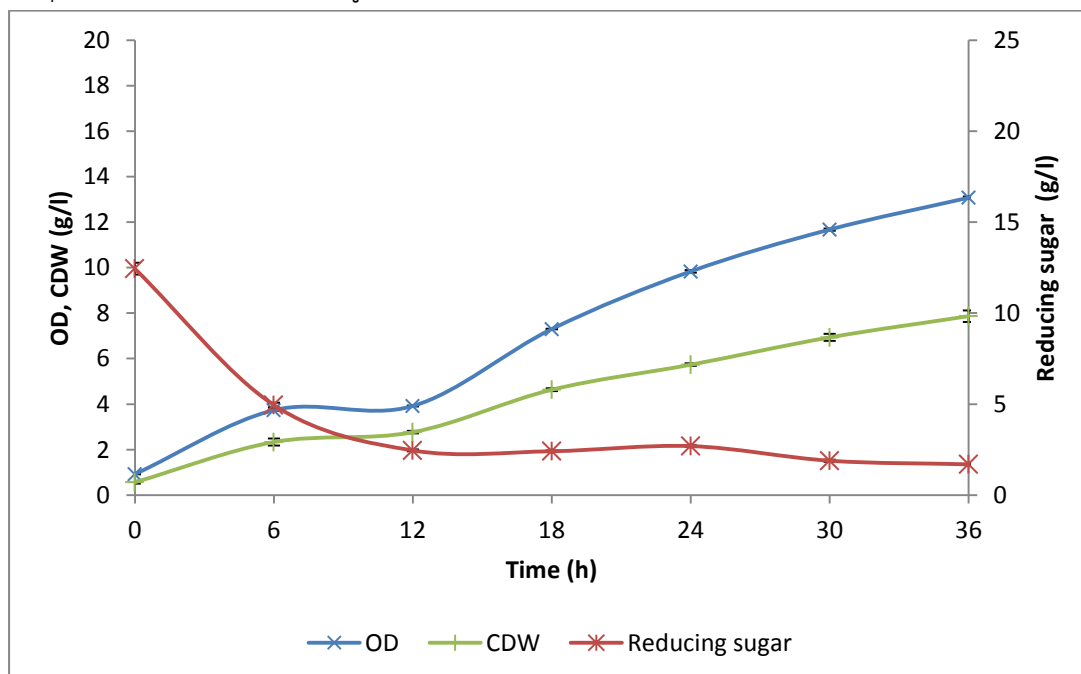


ภาพที่ 4-5 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)

จากภาพที่ 4-5 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BPM โดยใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญมีปริมาณเพิ่มขึ้นน้อยมากในแต่ละชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ในชั่วโมงที่ 36 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.42 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นเท่ากับ 7.95 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสพบว่าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 12.53 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมีปริมาณคงเหลือเท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตร

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *S. cerevisiae* ไม่ทำให้ผลเจริญที่ดี ทั้งนี้เนื่องจาก *S. cerevisiae* ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเองได้ ดังนั้นจึงทดลองเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกับเดกซ์ทรีนในการเพาะเลี้ยง ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

จากภาพที่ 4-6 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *S. cerevisiae* เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BPM โดยใช้เดกซ์ทรีนร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณเซลล์ของ *S. cerevisiae* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และยังคงมีการเจริญอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 36 โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.65 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 13.07 ในส่วนของปริมาณกลูโคสพบว่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมีปริมาณกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร

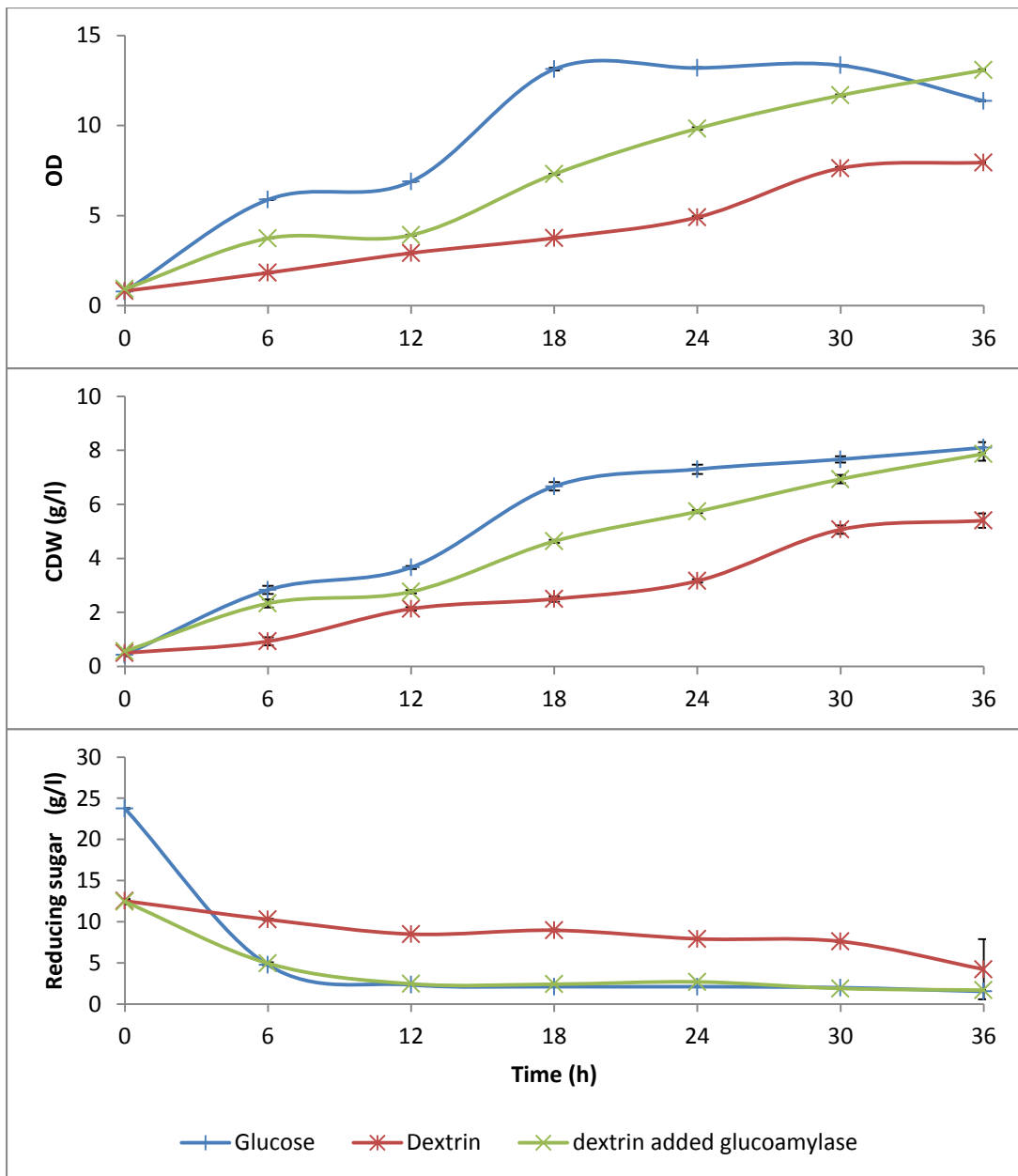


ภาพที่ 4-6 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้เดกซ์ทรีนร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้น (ภาพที่ 4-4 - 4-6) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนกับการใช้กลูโคส พบว่า *S. cerevisiae* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทริน หรือกล่าวได้ว่า เดกซ์ทรินมีประสิทธิภาพที่ไม่ดีสำหรับการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* เห็นได้จากปริมาณเซลล์จากการเพาะเลี้ยงโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 5.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าปริมาณเซลล์จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.20 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อมีการเติมเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (GC 358, สยามวิคตอรี, ประเทศไทย) ที่มีความสามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของเดกซ์ทริน ลงในสูตรอาหาร BPM ที่ใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ช่วยทำให้ *S. cerevisiae* มีการเจริญสูงขึ้น ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.65 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกลูโคสในการเพาะเลี้ยง พบว่า การเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งที่มีการเติมและไม่เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส มีค่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้จากวิธี DNS ต่ำกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันก็ตาม ทั้งนี้พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธี DNS ไม่สามารถวัดปริมาณน้ำตาลที่แท้จริงได้ และในระหว่างการเพาะเลี้ยงยังพบว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีปริมาณกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว การใช้เดกซ์ทรินจะมีปริมาณที่ลดลงอย่างรวดเร็วแค่เพียงในช่วงแรกเท่านั้น จากนั้นหากไม่มีการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมด้วยในการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลจะคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง แต่หากมีการเติมปริมาณน้ำตาลจะมีปริมาณลดลงในปริมาณที่เล็กน้อยเท่านั้น

จะเห็นว่าเดกซ์ทรินถึงแม้จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากลูโคสสำหรับการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเซลล์ แต่หากมีการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเดกซ์ทรินไปพร้อม ๆ กับการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* จะช่วยทำให้ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกับการใช้กลูโคส ดังนั้นจึงเลือกใช้การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรินที่มีการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

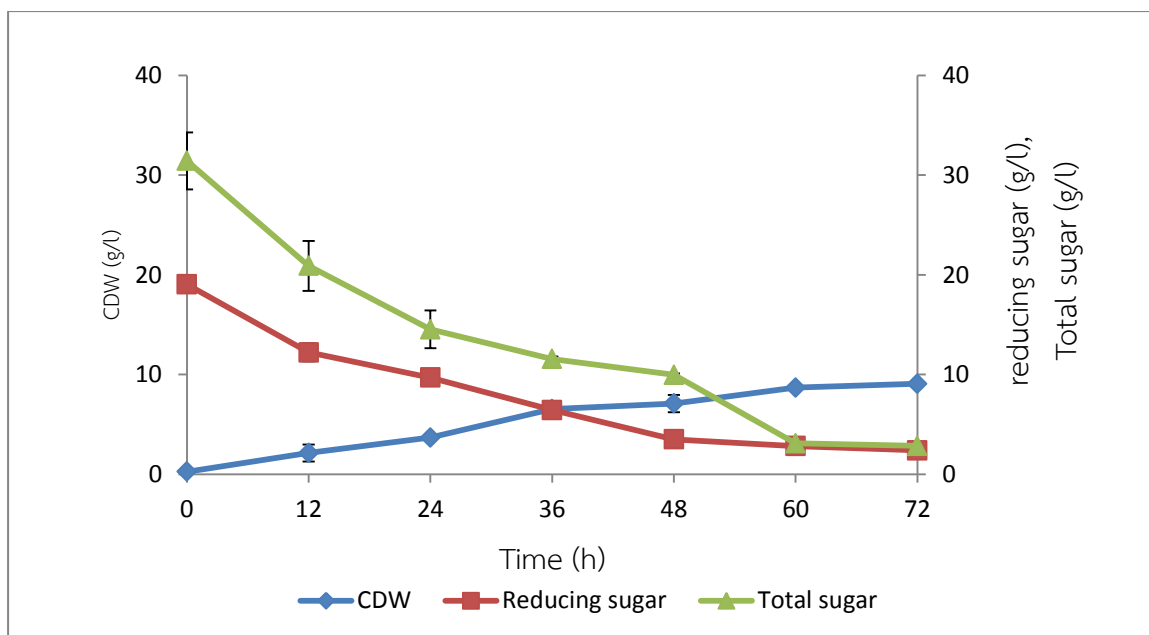


ภาพที่ 4-7 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส เดกซ์ทรีน และเดกซ์ทรีนร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

1.3 A. *oryzae*

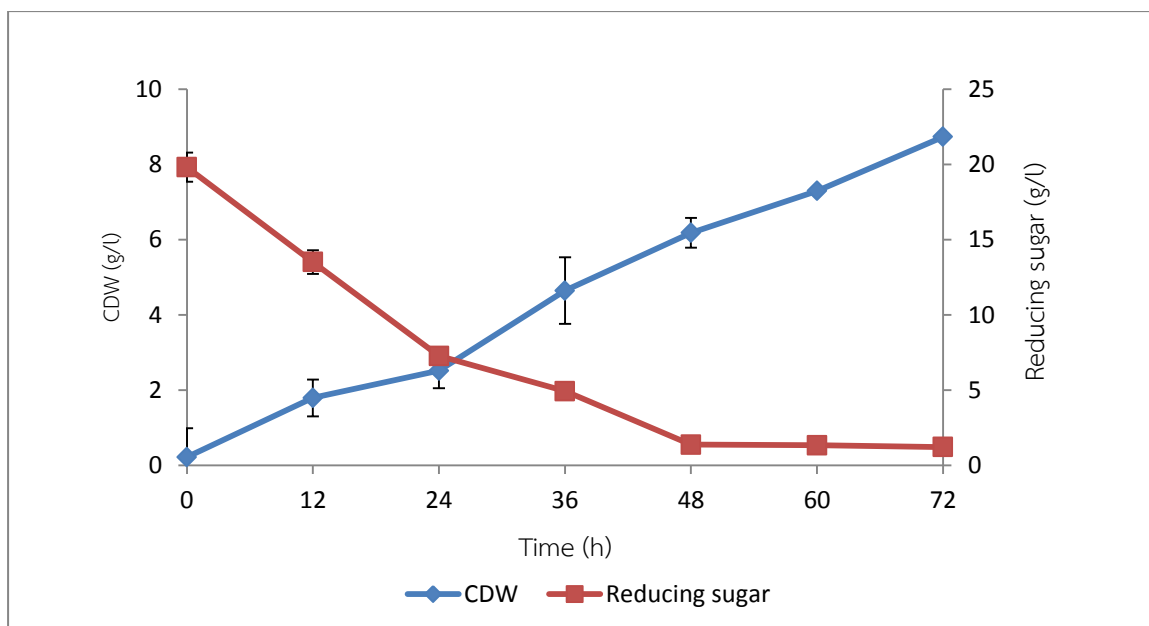
จากการศึกษาข้างต้นที่พบว่าสูตรอาหาร BPM ที่มีเติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลสำหรับการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* จึงมีการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยเลือกใช้เดกซ์ทรีน ซึ่งทำการศึกษา โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่มีเติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้กลูโคส และเดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-8 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่มีเติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นแนวโน้มคงที่ จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.08 ± 0.87 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าช่วง 0-36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ถึงชั่วโมงสุดท้าย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 2.84 ± 0.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 2.39 ± 0.36 กรัมต่อลิตร และลักษณะการเจริญเป็นดังภาพที่ 4-24 ซึ่งเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 0 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12-24 เริ่มมีการเจริญเป็นเส้นใย (filamentous) สังเกตจากความขุ่นของอาหาร แต่เมื่อเวลาผ่านไปชั่วโมงที่ 36-72 เริ่มมีการเจริญแบบเพลเล็ต (pellet) ที่เกิดจากเส้นใยมีการขดตัวเป็นก้อนกลม ขนาดของเพลเล็ตจะใหญ่ขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง



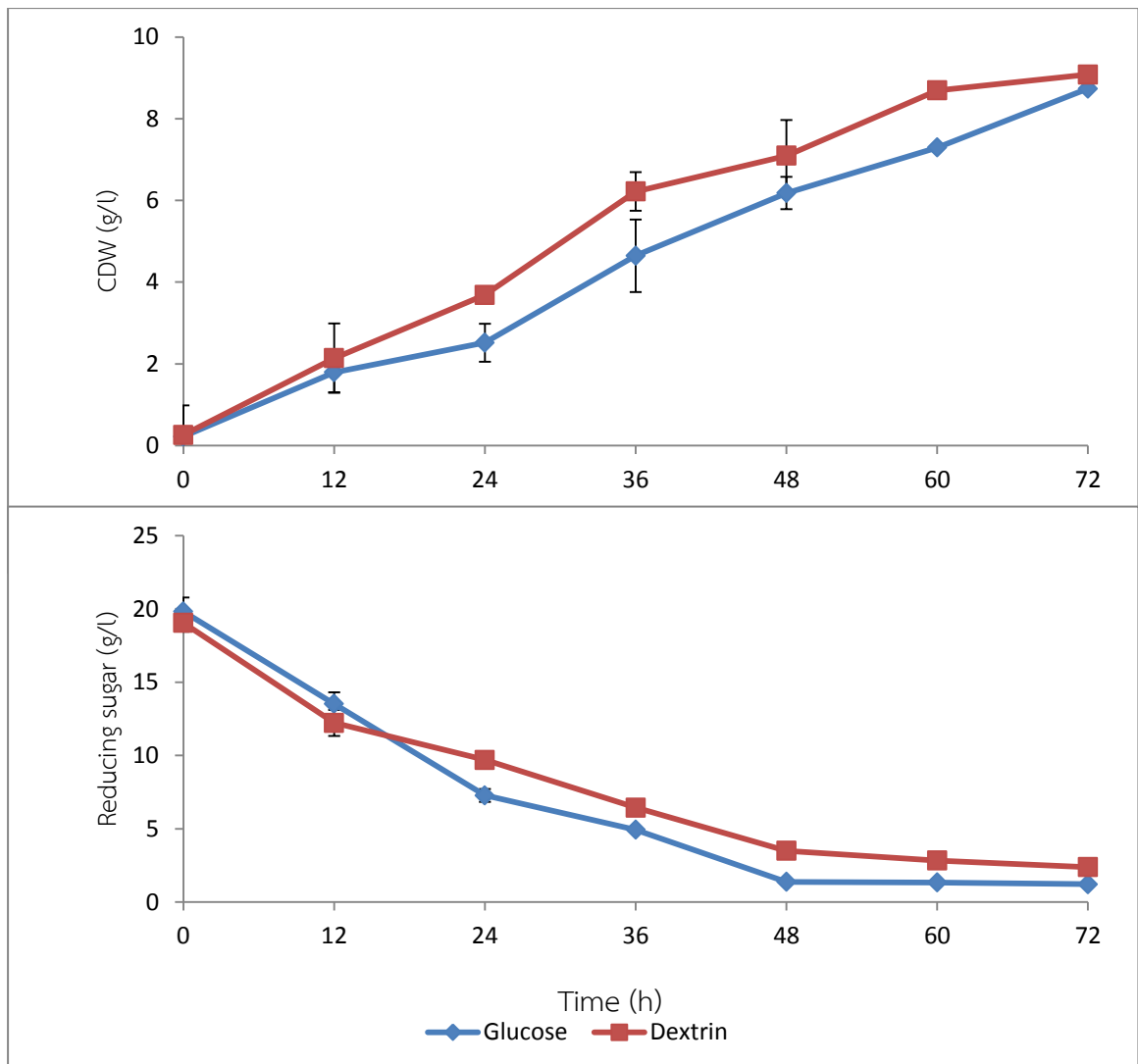
ภาพที่ 4-8 การเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่มีเติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้
เดกซ์ทริน เป็นแหล่งคาร์บอน

จากภาพที่ 4-9 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่มีเติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีประสิทธิภาพรองลงมา โดยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 8.73 ± 0.40 กรัมต่อลิตร ในส่วนของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 19.82 ± 0.45 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าช่วง 0-36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ถึงชั่วโมงสุดท้าย มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 1.23 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และลักษณะการเจริญเป็นดังภาพที่ 4-26 ซึ่งเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 0 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12 เริ่มมีการเจริญเป็นเส้นใย (filamentous) สังเกตจากความขุ่นของอาหาร แต่เมื่อเวลาผ่านไปชั่วโมงที่ 24-72 มีการเจริญแบบเพลเล็ต (pellet) ที่เกิดจากเส้นใยมีการขดตัวเป็นก้อนกลม ขนาดของเพลเล็ตจะใหญ่ขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4-9 การเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ เดกซ์ทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาการเจริญของ *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกันในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ เดกซ์ทรีน และกลูโคส ดังภาพที่ 4-10 พบว่า แนวโน้มการเจริญของ *A. oryzae* จากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิด มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ การเจริญเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่ 0-36 หลังจากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้าย แต่ถึงแม้ว่าจะมีทิศทางเดียวกันแต่ปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือการใช้เดกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณเซลล์ *A. oryzae* สูงกว่า โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.09 ± 0.87 กรัมต่อลิตร มีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนี้เป็นไปอย่างช้า ๆ ในระหว่างเพาะเลี้ยง ขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.73 ± 0.36 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-10 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

2. ผลการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ “หลายกะต่อนื่องอย่างเข้มงวด”

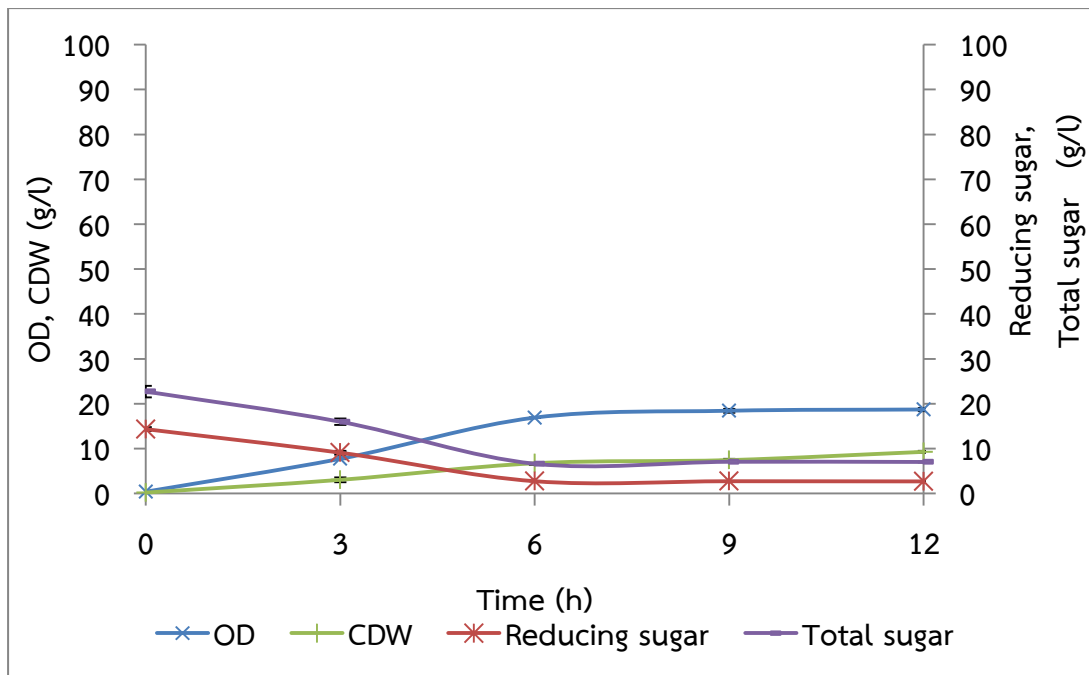
2.1 ผลของเดกซ์ทรินความเข้มข้นสูงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบทั้ง 3 ชนิด

2.1.1 *E. coli*

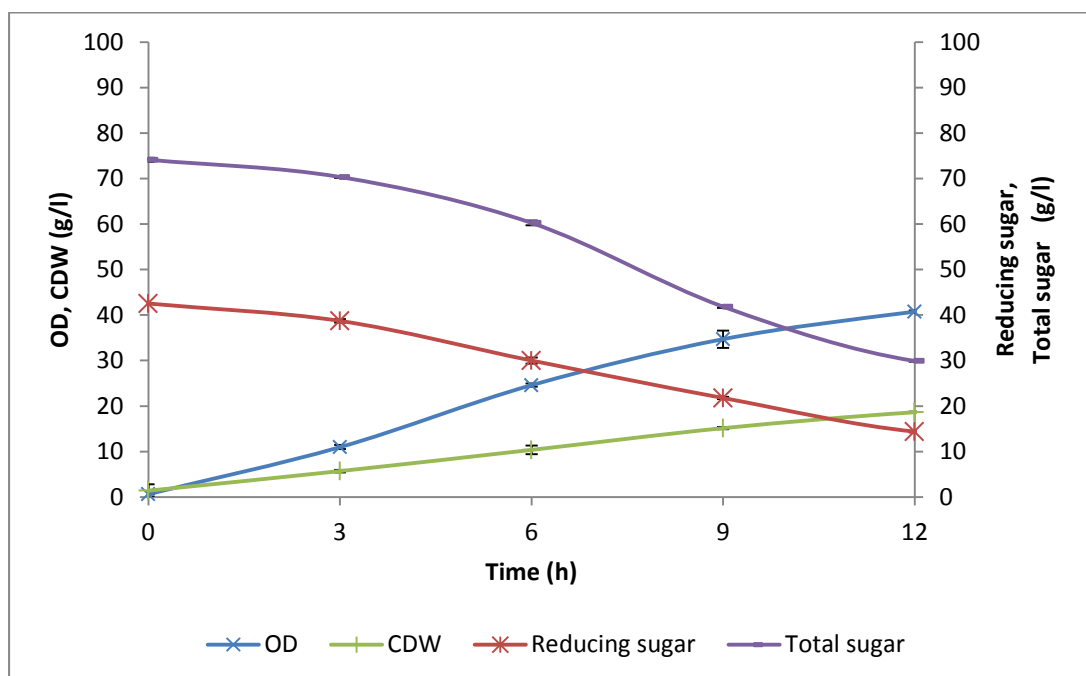
จากการศึกษาผลการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ของ *E. coli* ในอาหารสูตร BPM เปรียบเทียบการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก (Fermenter) ขนาดบรรจุ 5 ลิตร ปริมาตรการทำงานทั้งหมดเท่ากับ 3000 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อความเข้มข้นคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 อัตราการเติมอากาศแปรผันตามความเข้มข้นของเดกซ์ทรินเท่ากับ 1, 2 และ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที่ ตามลำดับ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500-700 รอบต่อนาที่ ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

จากภาพที่ 4-11 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *E. coli* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร อัตราการเติมอากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที่ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500 รอบต่อนาที่ พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.27 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 18.71 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคส และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 ชั่วโมงแรก สอดคล้องกับการเจริญเติบโต และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 2.68 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด เท่ากับ 7.02 กรัมต่อลิตร

จากภาพที่ 4-12 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *E. coli* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที่ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 600 รอบต่อนาที่ พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก จากนั้นอัตราการเจริญจึงเริ่มน้อยลง จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 18.63 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 40.73 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก สอดคล้องกับการเจริญเติบโต และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 14.38 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด เท่ากับ 29.91 กรัมต่อลิตร

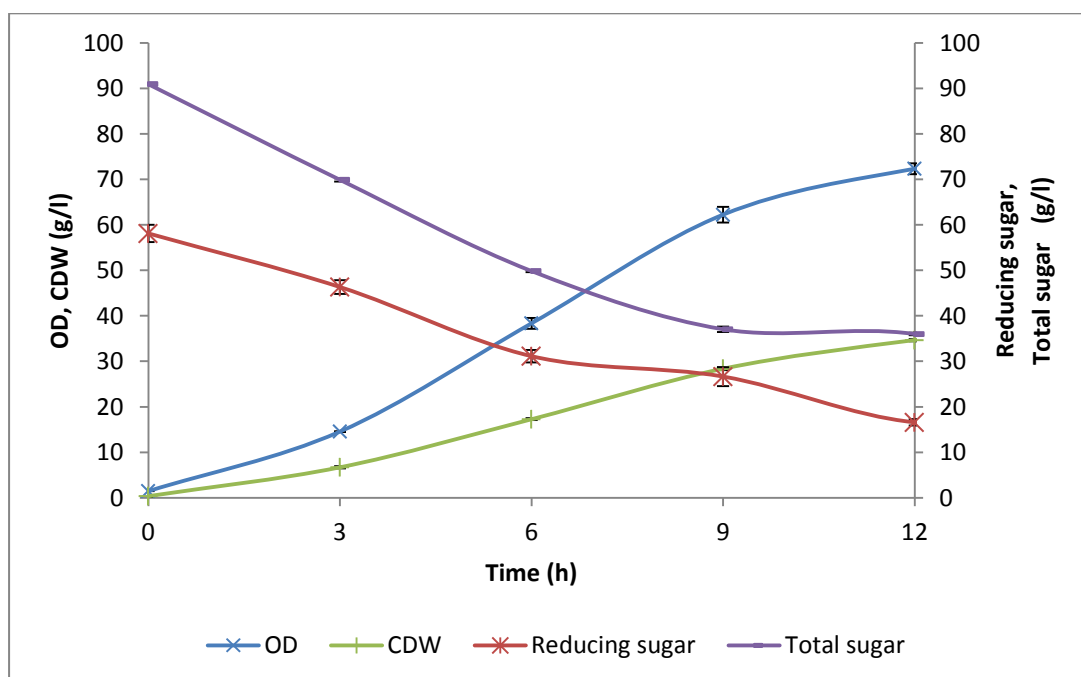


ภาพที่ 4-11 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)



ภาพที่ 4-12 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

จากภาพที่ 4-13 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *E. coli* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรีนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร อัตราการเติมอากาศ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อหน้าที่ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 700 รอบต่อนาที พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก จากนั้นอัตราการเจริญเริ่มน้อยลง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 18 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 34.67 กรัมต่อลิตร ความชื้นเท่ากับ 72.32 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคส และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับการเจริญเติบโต และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 16.59 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด เท่ากับ 35.99 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-13 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงที่ผ่านมาซึ่งพบว่า เดกซ์ทรีนมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดสำหรับเพาะเลี้ยง *E. coli* จึงมีการศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์ทรีนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* ดังภาพที่ 4-14 พบว่าการเจริญแปรผันตามความเข้มข้นของเดกซ์ทรีนที่เพิ่มสูงขึ้น คือเมื่อเวลาผ่านไปจนครบ 12 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ทำให้ *E. coli* มีการสร้างเซลล์ในปริมาณสูงสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 34.67 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ

18.63 กรัมต่อลิตร และการเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรีนความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.27 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของเดกซ์ทรีนที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยง ส่งผลต่อระยะเวลาของช่วง Log Phase คือ การใช้เดกซ์ทรีนที่ความเข้มข้นสูงมีระยะเวลาของช่วง Log Phaseที่ยาวนานกว่า ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 0-9 ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร Log Phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 และความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร Log Phaseอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 0-3

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพิจารณาจากค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 การเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร มีปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 7.02, 29.91 และ 35.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4-1 พารามิเตอร์การเจริญของ *E. coli* จากการหมักแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรีนที่ระดับความแตกต่างกัน

ความเข้มข้น เดกซ์ทรีน (g/l)	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	Yx/s (g/g)	rx (g/l/h)	rs (g/l/h)
20	9.27±0.23 ^a	0.33±0.01 ^a	0.36±0.03 ^a	0.97±0.02 ^a	2.69±0.23
60	18.63±0.12 ^b	0.58±0.01 ^b	0.40±0.01 ^{ab}	1.47±0.01 ^b	3.69±0.03
100	34.67±0.25 ^c	0.47±0.00 ^c	0.45±0.04 ^b	2.81±0.03 ^c	6.23±0.49

x คือ ปริมาณมวลเซลล์ คัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

Yx/s คือ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

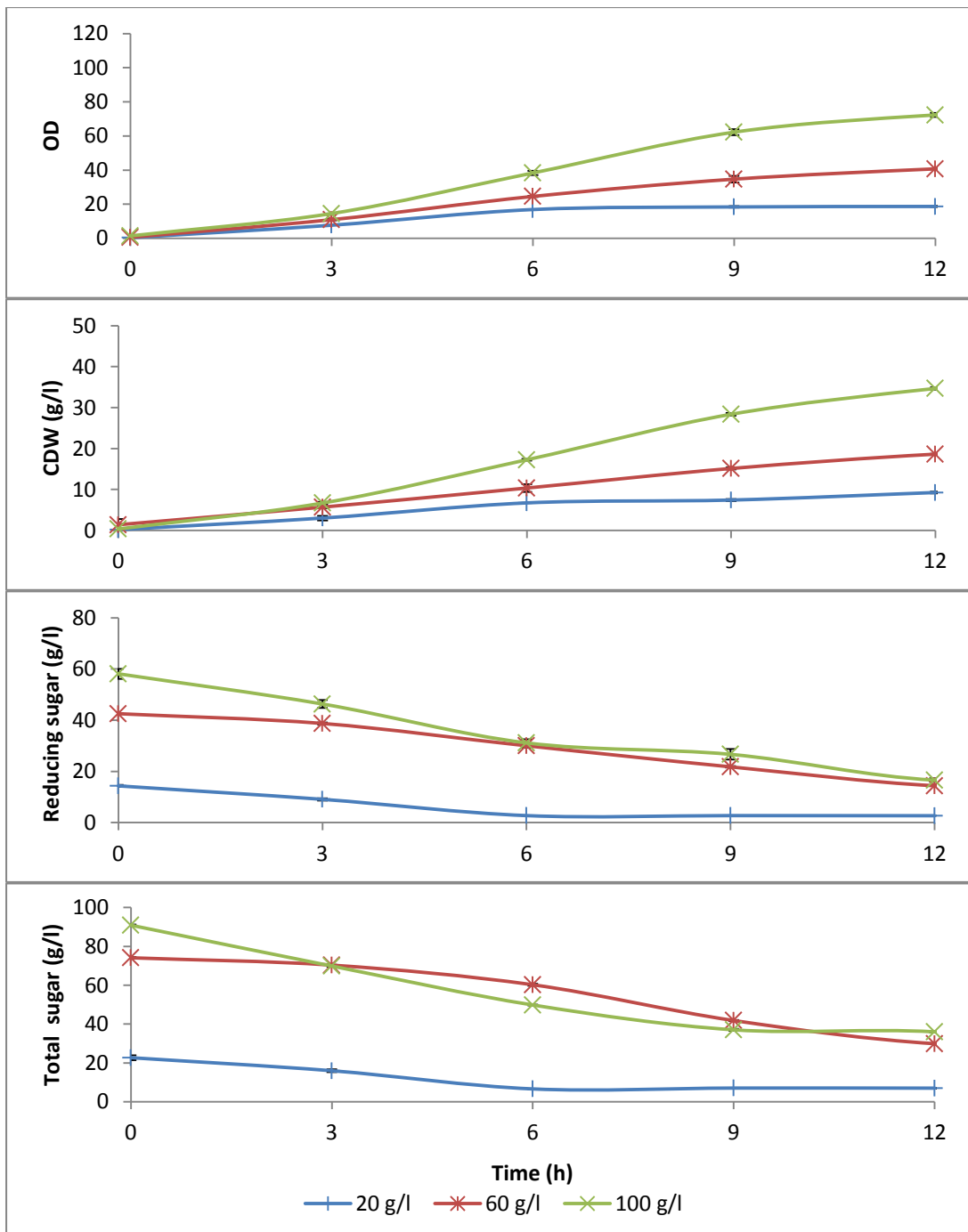
rx คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

rs คือ อัตราการใช้น้ำตาล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์การเจริญของ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่ระดับความเข้มข้นเดกซ์ทรีนแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-1) พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญที่ดีที่สุด มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 34.67 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.47 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (Yx/s) เท่ากับ 0.44 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (rx) เท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (rs) เท่ากับ 6.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญ
รอรลงมา มีค่ามวลเซลล์ เท่ากับ 18.63 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.58 ต่อชั่วโมง
ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.39 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ เท่ากับ 1.47
กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล เท่ากับ 3.69 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความที่ระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลการ
เจริญต่ำสุด มีค่ามวลเซลล์ เท่ากับ 9.27 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.32 ต่อชั่วโมง
ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.35 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ เท่ากับ 0.97
กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล เท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



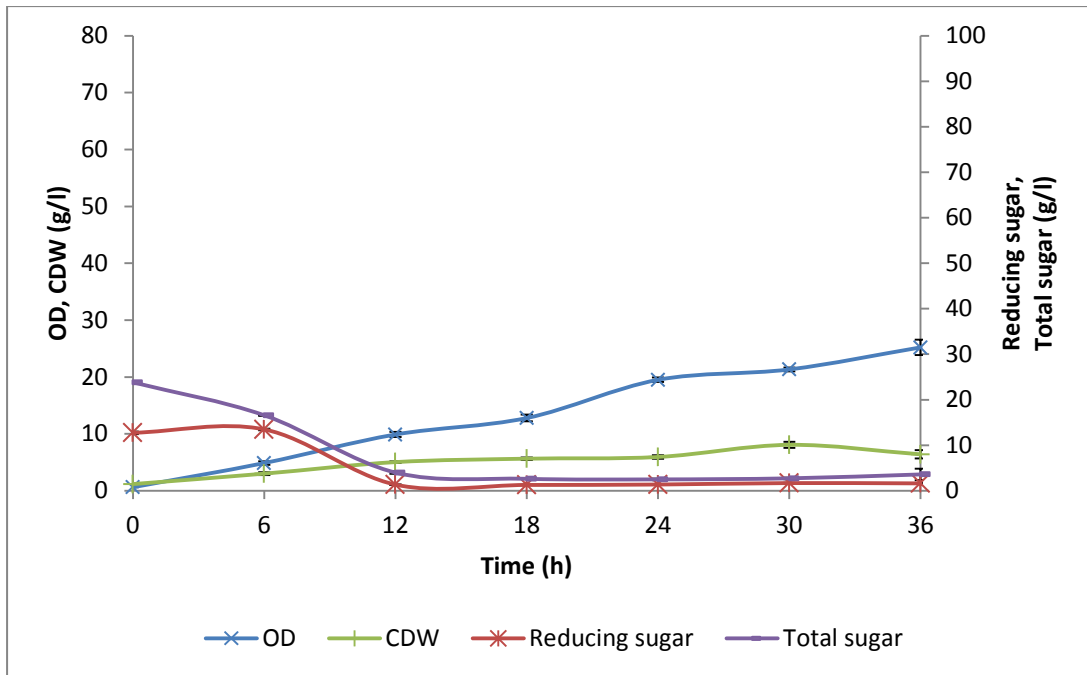
ภาพที่ 4-14 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

2.1.2 *S. cerevisiae*

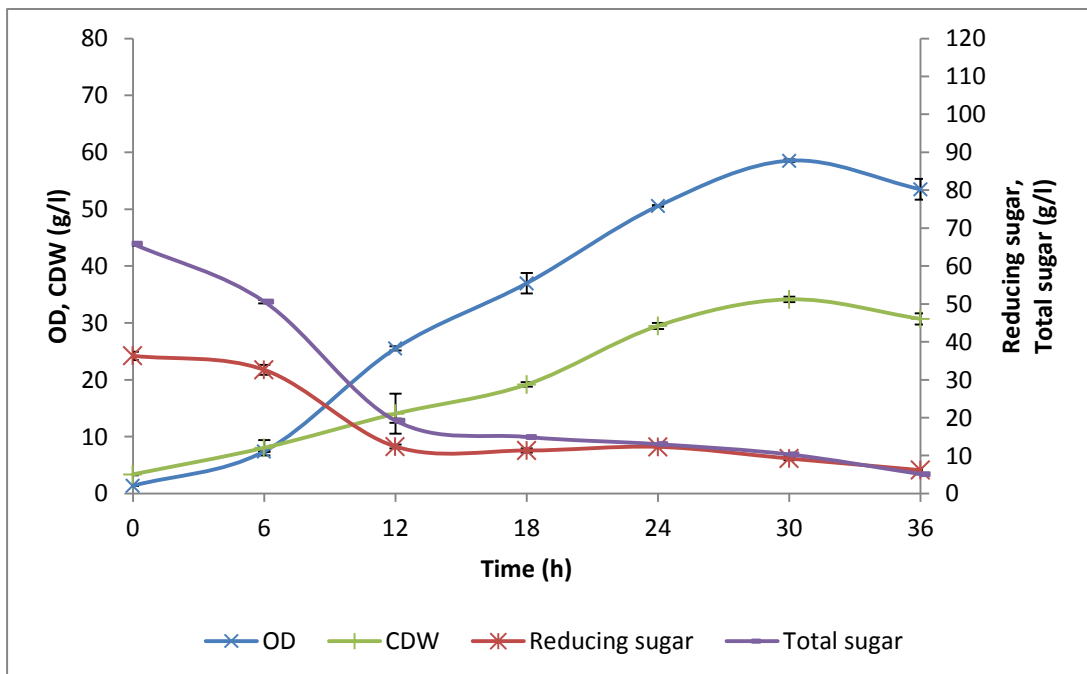
จากการศึกษาผลการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ของ *S. cerevisiae* ในอาหารสูตร BPM เปรียบเทียบการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ขนาดบรรจุ 5 ลิตร ปริมาตรการทำงานทั้งหมดเท่ากับ 3000 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อความเข้มข้นคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 อัตราการเติมอากาศแปรผันตามความเข้มข้นของเดกซ์ทริน เท่ากับ 1- 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที่ ตามลำดับ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500-700 รอบต่อนาที่ ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

จากภาพที่ 4-15 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *S. cerevisiae* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร อัตราการเติมอากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที่ อัตราการกวนผสม 500 รอบต่อนาที่ พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-24 ชั่วโมงแรก จากนั้นการจึงเข้าสู่ระยะคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.07 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 21.33 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 1.61กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด เท่ากับ 3.58 กรัมต่อลิตร

จากภาพที่ 4-16 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *S. cerevisiae* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที่ อัตราการกวนผสม 600 รอบต่อนาที่ พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-30 ชั่วโมงแรก จากนั้นการจึงเข้าสู่ระยะคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 34.13 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 58.52 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-18 ชั่วโมงแรก และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 6.152 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด เท่ากับ 5.12 กรัมต่อลิตร

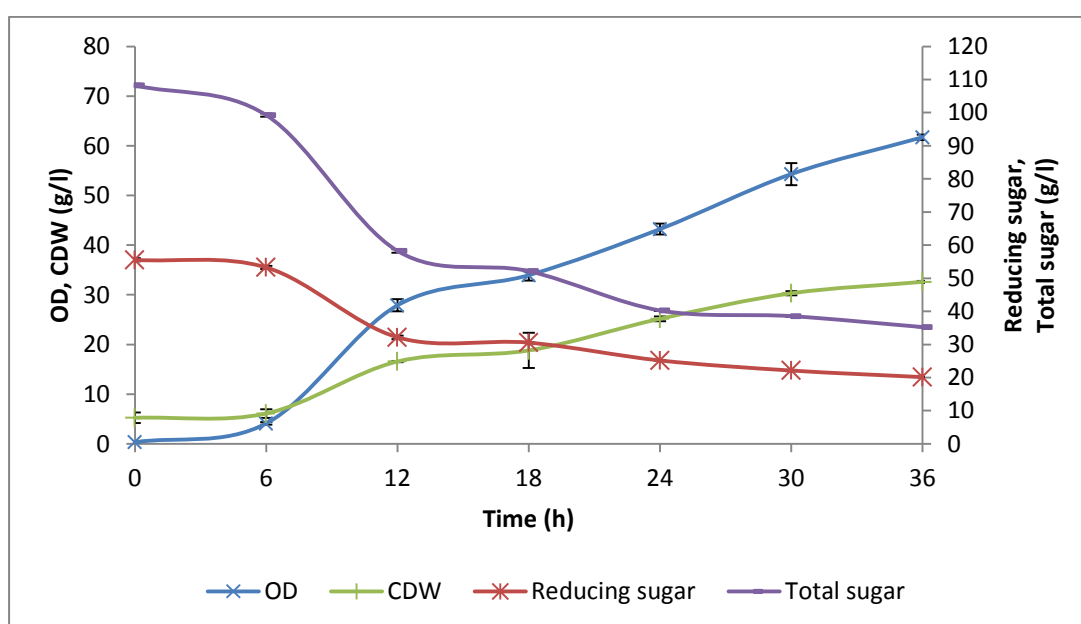


ภาพที่ 4-15 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-16 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

จากภาพที่ 4-17 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *S. cerevisiae* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร อัตราการเติมอากาศ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสม 700 รอบต่อนาที พบว่า มีการเจริญอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 36 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 32.60 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 61.72 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-18 ชั่วโมงแรก และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 20.14 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือทั้งหมด เท่ากับ 35.25 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-17 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงที่ผ่านมา ภาพที่ 4-18 ซึ่งพบว่า เดกซ์ทรินมีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* จึงมีการศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์ทรินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ทำให้ *S. cerevisiae* มีการสร้างเซลล์ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 32.60 และ 30.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.40 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพิจารณาจากค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 การเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร มีปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 3.58, 5.12 และ 35.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4-2 พารามิเตอร์การเจริญของ *S. cerevisiae* จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

ความเข้มข้น เดกซ์ (g/l)	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	r _x (g/L/h)	r _s (g/L/h)
20	8.07±0.55 ^a	0.12±0.00 ^a	0.19±0.01 ^a	0.32±0.01 ^a	1.65±0.02 ^a
60	34.13±0.65 ^b	0.30±0.03 ^c	0.53±0.04 ^c	1.17±0.02 ^c	3.64±0.09 ^c
100	32.60±2.01 ^b	0.19±0.00 ^b	0.41±0.03 ^b	0.95±0.05 ^b	3.10±0.09 ^b

x คือ ปริมาณมวลเซลล์ คัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

Y_{x/s} คือ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

r_x คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

r_s คือ อัตราการใช้น้ำตาล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์การเจริญของ *S. cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่ระดับความเข้มข้นเดกซ์ทรีนแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-2) พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญดีที่สุด มีค่ามวลเซลล์ (X) เท่ากับ 34.13 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.30 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (Y_{x/s}) เท่ากับ 0.53 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 1.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 3.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญรองลงมา ค่ามวลเซลล์ 32.60 เท่ากับ กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.19 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ เท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล เท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

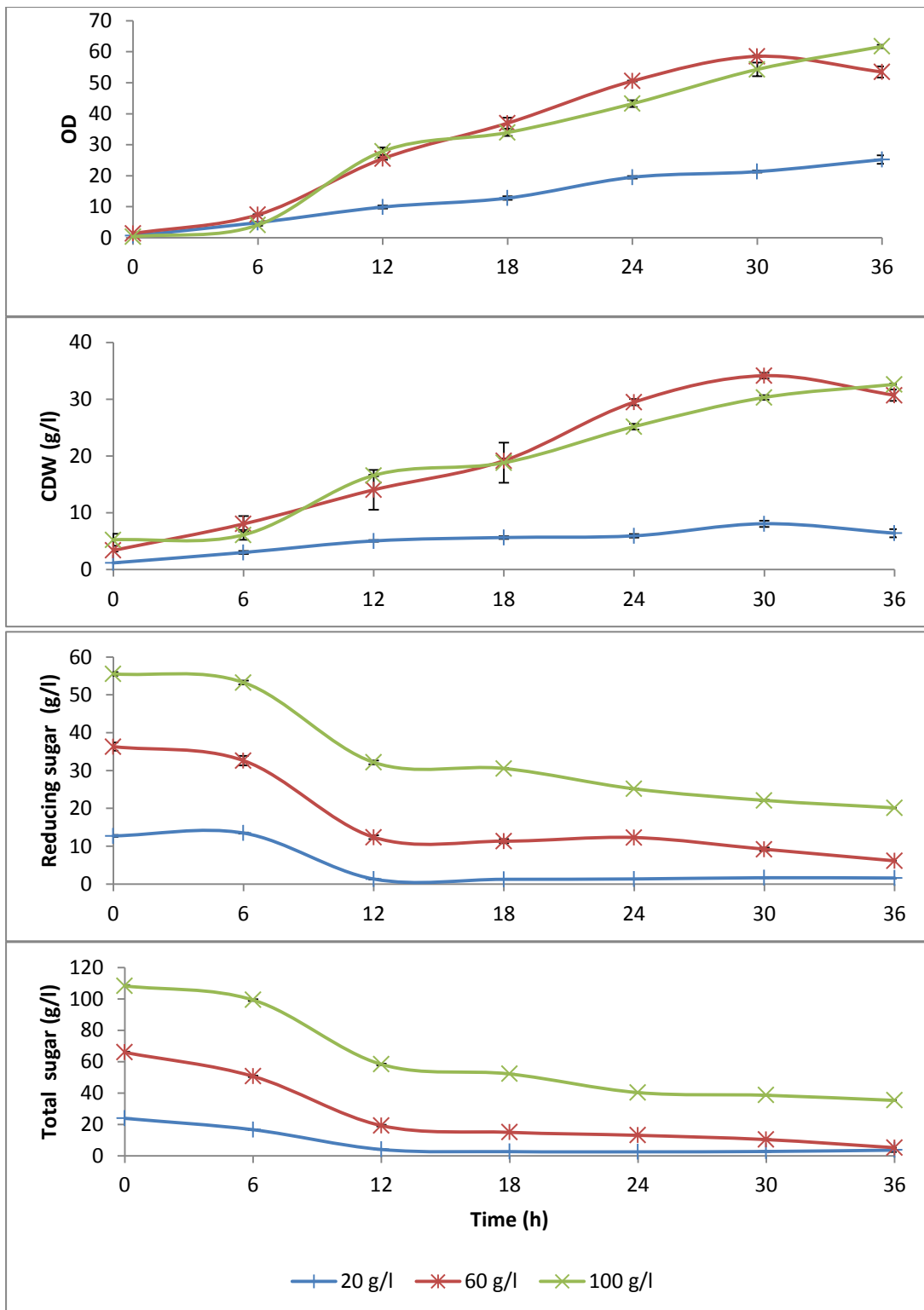
ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลการเจริญต่ำสุด ค่ามวลเซลล์ เท่ากับ 8.07 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง

ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.19 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ เท่ากับ 0.32 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล เท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

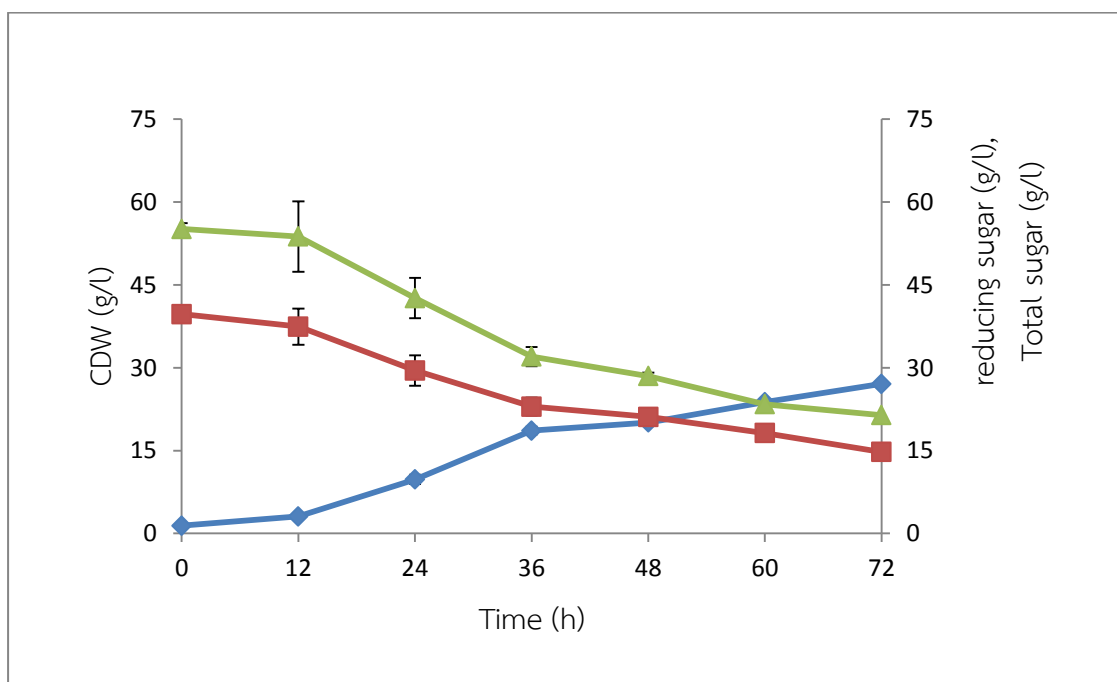
2.1.3 *A. oryzae*

จากการศึกษาการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในอาหารสูตร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 30, 60 และ 90 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก (Fermenter) ขนาดบรรจุ 5 ลิตร ปริมาณการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 3000 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อความเข้มข้นคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการเพาะเลี้ยงทั้งหมด ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5 อัตราการเติมอากาศแปรผันตามความเข้มข้นของเดกซ์ทริน เท่ากับ 1, 2 และ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที ตามลำดับ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500-700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

จากภาพที่ 4-19 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการกวนอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสมเท่ากับ 600 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยพบว่า *A. oryzae* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นแนวโน้มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 27.07 ± 0.61 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าช่วง 0-36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ถึงชั่วโมงสุดท้าย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 21.42 ± 0.62 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 14.76 ± 0.39 กรัมต่อลิตร และลักษณะของการเจริญเป็นดังภาพที่ 4-29 จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 0 มีเพลเล็ต (pellet) ขนาดเล็ก เนื่องจากหัวเชื้อที่ใช้เป็นแบบเพลเล็ต ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12 ขนาดของเพลเล็ตมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ในชั่วโมงที่ 24-72 เพลเล็ตเริ่มเล็กลงเรื่อย ๆ เนื่องจากความเร็วรอบที่สูงทำให้ขนาดเพลเล็ตที่เล็ก และมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งสีของอาหารที่เกิดขึ้นมีความขุ่นขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง



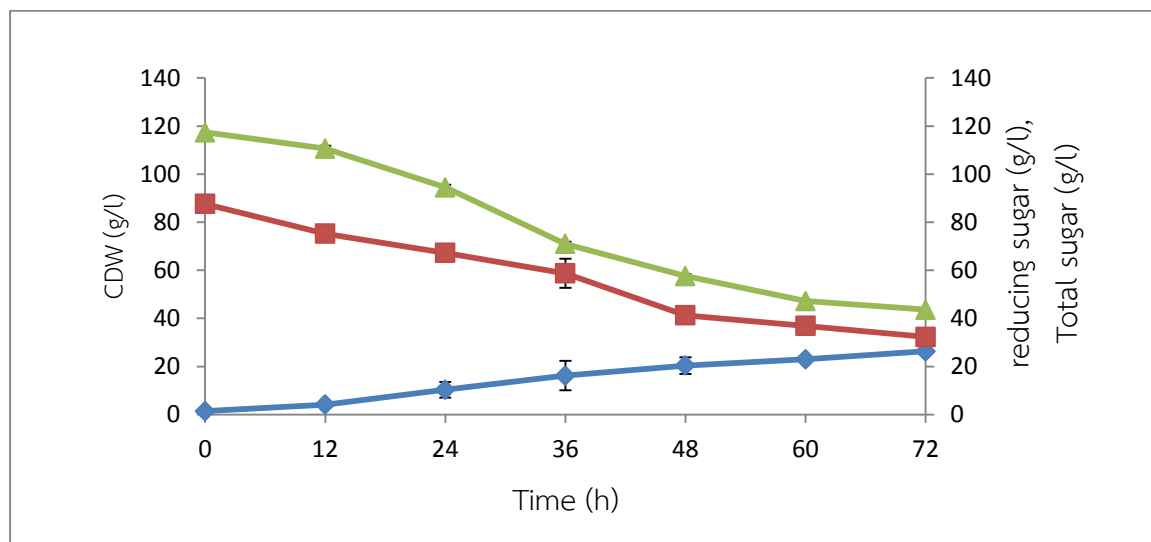
ภาพที่ 4-18 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ)



ภาพที่ 4-19 การเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เตกซ์ทริน ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ) โดยแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (—◆—), ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (—■—) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (—▲—)

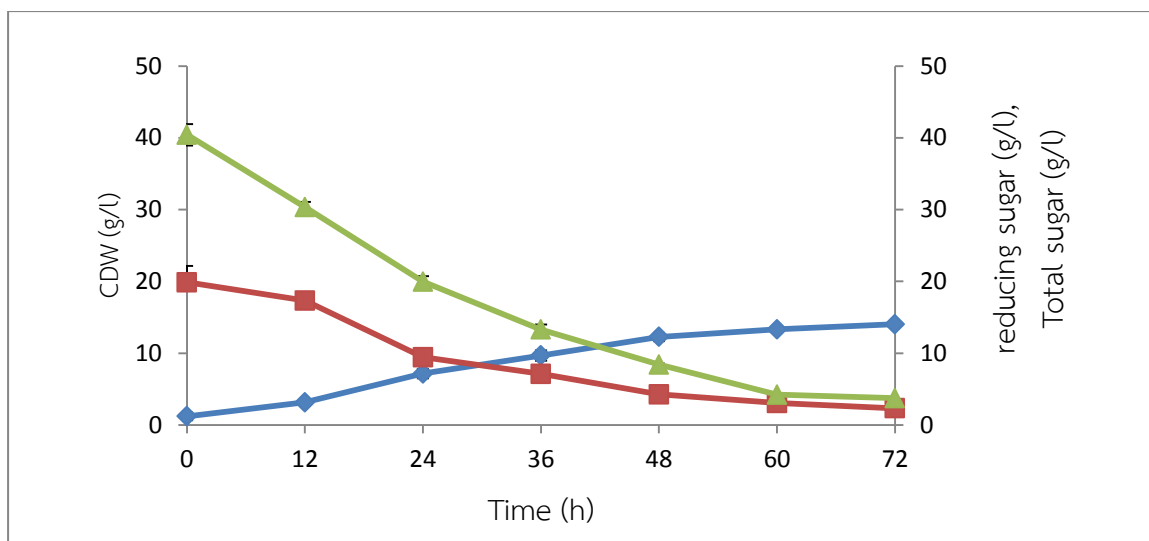
จากภาพที่ 4-20 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เตกซ์ทรินความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร อัตราการกวนอากาศ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสมเท่ากับ 700 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพรองลงมา โดยพบว่า *A. oryzae* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นแนวโน้มคงที่ จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 26.32 ± 3.49 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าช่วง 0-36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ถึงชั่วโมงสุดท้าย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 43.65 ± 0.65 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 32.32 ± 4.32 กรัมต่อลิตร และลักษณะของการเจริญเป็นดังภาพที่ 4-31 จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 0 มีpellet ขนาดเล็ก เนื่องจากหัวเชื้อที่ใช้เป็นแบบpellet ในขณะชั่วโมงที่ 12 ขนาดของpellet มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ในชั่วโมงที่ 24-72 pellet เริ่มเล็กลงเรื่อย ๆ และมีการเจริญที่เป็นเส้นใยปนอยู่ด้วย

เนื่องจากความเร็วรอบที่สูงทำให้ขนาดเพลล็ดที่เล็ก และมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งสีของอาหารที่เกิดขึ้นมีความขุ่นขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการเจริญเพิ่มขึ้นและความหนืดของอาหาร ตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4-20 การเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ) โดยแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (—◆—), ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (—■—) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (—▲—)

จากภาพที่ 4-21 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้декซ์ทรินความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร อัตราการกวนอากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500 รอบต่อนาที พบว่า *A. oryzae* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นแนวโน้มคงที่ จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 14.04 ± 0.58 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าช่วง 0-36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่ถึงชั่วโมงสุดท้าย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 3.74 ± 0.16 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 2.32 ± 0.62 กรัมต่อลิตร และลักษณะของการเจริญเป็นดังภาพที่ 4-33จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 0 มีเพลล็ด (pellet) ขนาดเล็ก เนื่องจากหัวเชื้อที่ใช้เป็นแบบเพลล็ด ในขณะที่ชั่วโมงที่ 12 ขนาดของเพลล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ในชั่วโมงที่ 24-72 เพลล็ดเริ่มเล็กลงเรื่อย ๆ และมีการเจริญที่เป็นเส้นใยปนอยู่ด้วย เนื่องจากความเร็วรอบที่สูงทำให้ขนาดเพลล็ดที่เล็ก และมีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งสีของอาหารที่เกิดขึ้นมีความขุ่นขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4-21 การเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ในสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ) โดยแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (—◆—), ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (—■—) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (—▲—)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงที่ผ่านมาพบว่า เดกซ์ทรีนมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดสำหรับเพาะเลี้ยง *A. oryzae* จึงมีการศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์ทรีนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* พบว่าการเจริญแปรผันตามความเข้มข้นของเดกซ์ทรีนที่เพิ่มสูงขึ้น คือเมื่อเวลาผ่านไปจนครบ 72 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ทำให้ *A. oryzae* มีการสร้างเซลล์ในปริมาณสูงสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 27.0 ± 0.61 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 26.32 ± 3.49 กรัมต่อลิตร และการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ *A. oryzae* มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 14.04 ± 0.51 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพิจารณาจากค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 การเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 90, 60 และ 30 กรัมต่อลิตร มีปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 32.32, 14.76 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4-3 พารามิเตอร์การเจริญของ *A. oryzae* จากการหมักแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรีนที่ระดับ

ความแตกต่างกัน

ความเข้มข้น เดกซ์ทรีน (g/l)	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	R_s (g/L/h)	R_p (g/L/h)
30	14.04 ± 0.51	0.06	0.35	3.20	0.24
60	27.07 ± 0.61	0.07	0.76	1.34	0.48
90	26.32 ± 3.49	0.07	0.34	3.14	0.41

x คือ ปริมาณมวลเซลล์ คัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

s คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

$Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

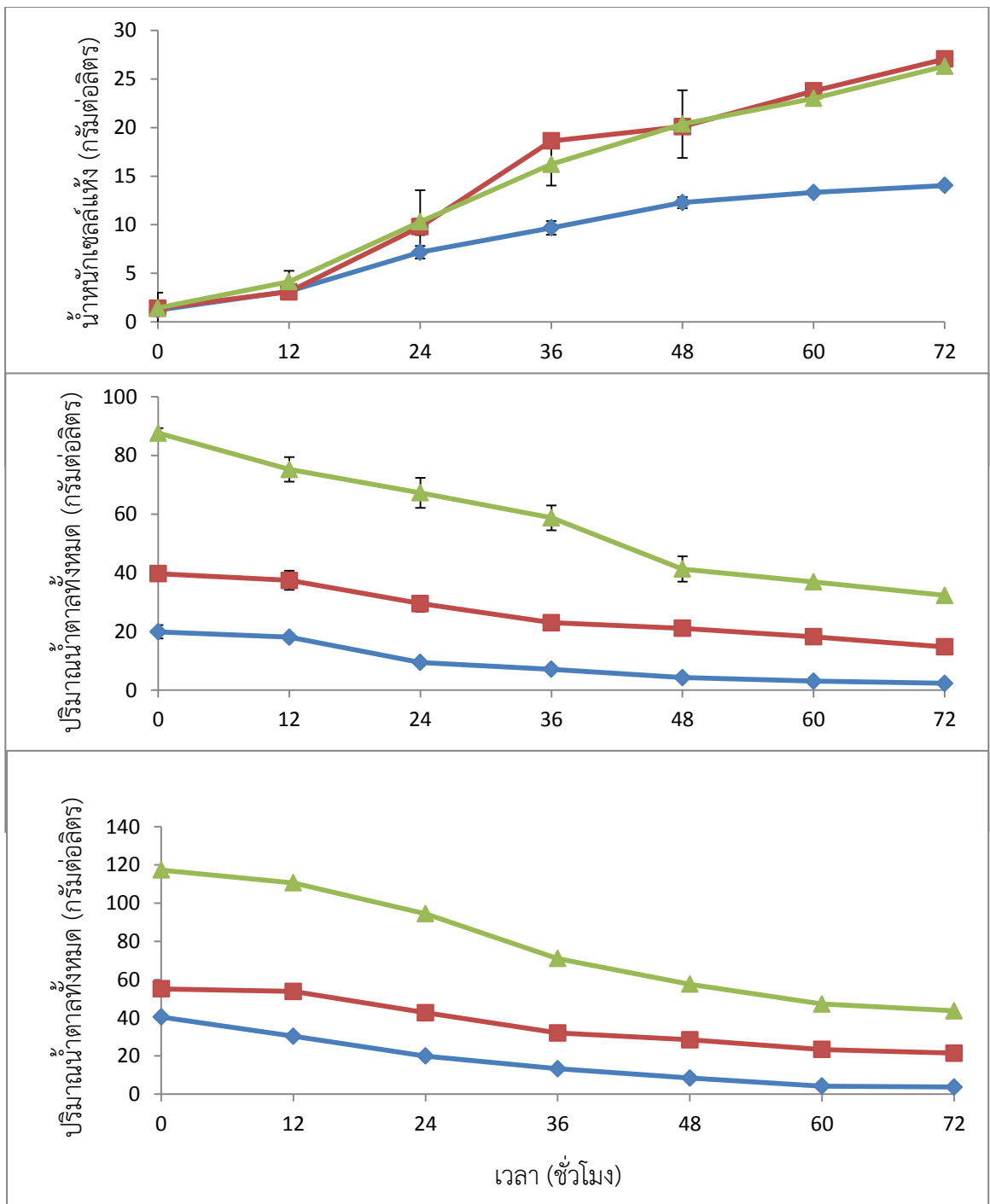
R_s คือ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

R_p คือ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เมื่อกำหนดค่าพารามิเตอร์การเจริญของ *A. oryzae* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่ระดับความเข้มข้นเดกซ์ทรีนแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-4) พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญดีที่สุด มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 27.07 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.76 กรัมต่อกรัม อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (R_s) เท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (R_p) เท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญรองลงมา มีค่ามวลเซลล์ เท่ากับ 26.32 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัม อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (R_s) เท่ากับ 3.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (R_p) เท่ากับ 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญรองลงมา มีค่ามวลเซลล์ เท่ากับ 14.04 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.06 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.35 กรัมต่อกรัม อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (R_s) เท่ากับ 3.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (R_p) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



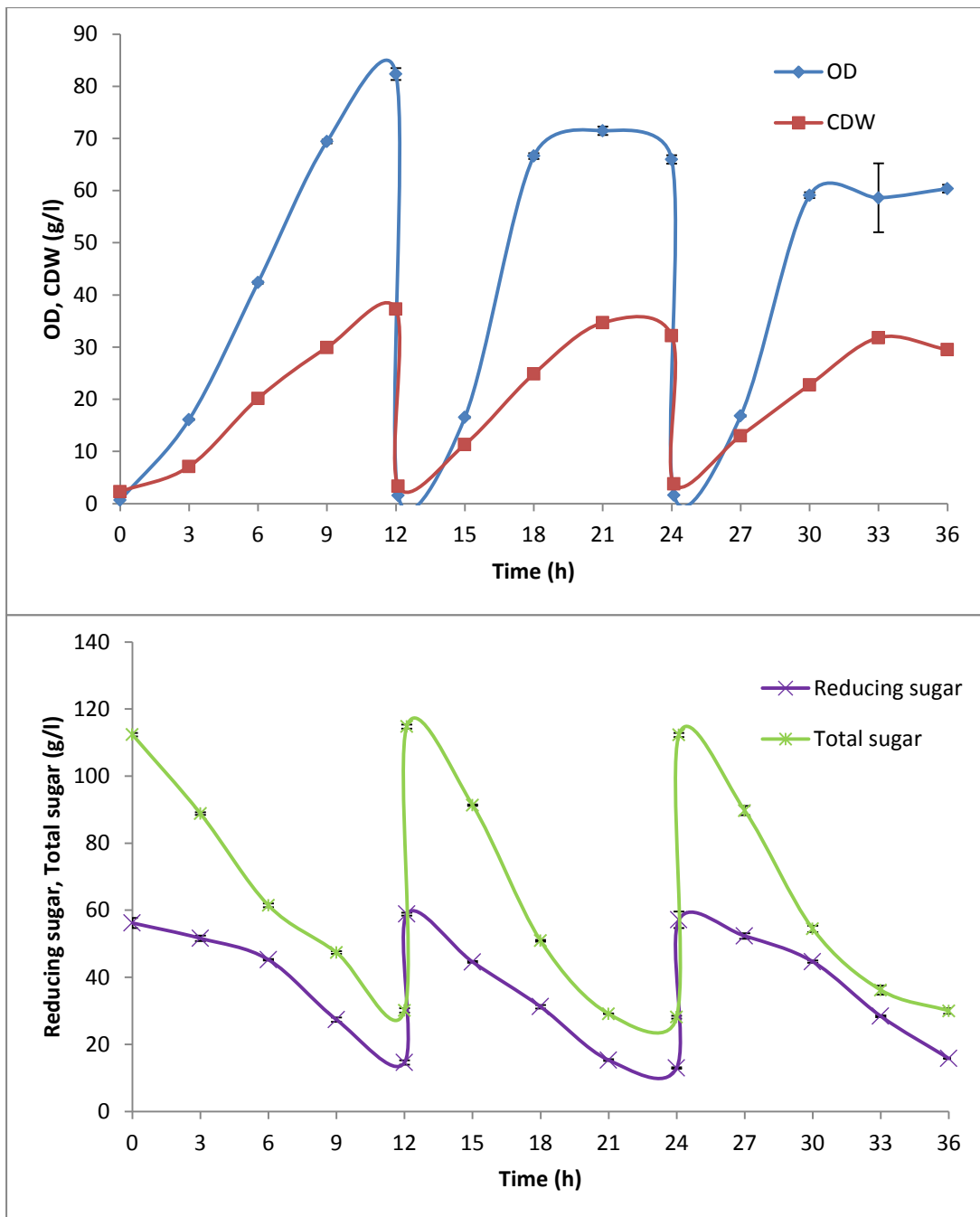
ภาพที่ 4-22 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ด้วยเดกซ์ทรีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (—◆—), ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร (—■—) และความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร (—▲—)

2.2 ผลของการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มงวด

2.2.1 *E. coli*

จากภาพที่ 4-24 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *E. coli* ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง ในสูตรอาหาร BPM ที่มีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ใช้เดกซ์ทริน ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมพีเอช ระหว่างการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 อัตราการเติมอากาศ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบพัดเท่ากับ 700 รอบต่อ นาที พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะครั้งที่ 1 เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุดเท่ากับ 37.30 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นเท่ากับ 82.35 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 112.37 กรัมต่อ ลิตร และลดลงเหลือเพียง 30.14 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 2 พบว่า การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วในช่วง 0-9 ชั่วโมงเท่านั้น จากนั้นเข้าสู่ระยะคงที่และลดลงในชั่วโมงที่ 12 มีค่าน้ำหนัก เซลล์แห้งเท่ากับ 32.20 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 71.47 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 114.78 กรัม ต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้นับว่ามีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 28.12 กรัมต่อ ลิตร และในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 3 มีลักษณะการเจริญที่คล้ายกับครั้งที่ 2 คือมีการเจริญ อย่างรวดเร็วในช่วง 0-9 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงลดลง เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 31.80 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 58.62 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 112.27 และลดลง จนเหลือ 29.99 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์การเจริญของ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง (ตารางที่ 4-4) พบว่า การเพาะเลี้ยงในแต่ละกะนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 37.30 32.20 และ 31.80 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.50 0.47 และ 0.44 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.44 0.39 และ 0.40 กรัมต่อกรัม อัตรา การสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.02 3.69 และ 3.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 6.85 7.28 และ 6.91 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4-24 ผลการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4-4 พารามิเตอร์การเจริญของ *E. coli* จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง

batch	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	Yx/s (g/g)	rx (g/L/h)	rs (g/L/h)
1	37.30±0.86 ^b	0.50±0.01 ^c	0.44±0.01 ^b	3.02±0.04 ^a	6.85±0.10 ^a
2	32.20±0.95 ^a	0.47±0.00 ^b	0.39±0.01 ^a	3.69±0.10 ^c	7.28±0.07 ^b
3	31.80±0.96 ^a	0.44±0.01 ^a	0.40±0.01 ^a	3.35±0.10 ^b	6.91±0.12 ^a

x คือ ปริมาณมวลเซลล์ คัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

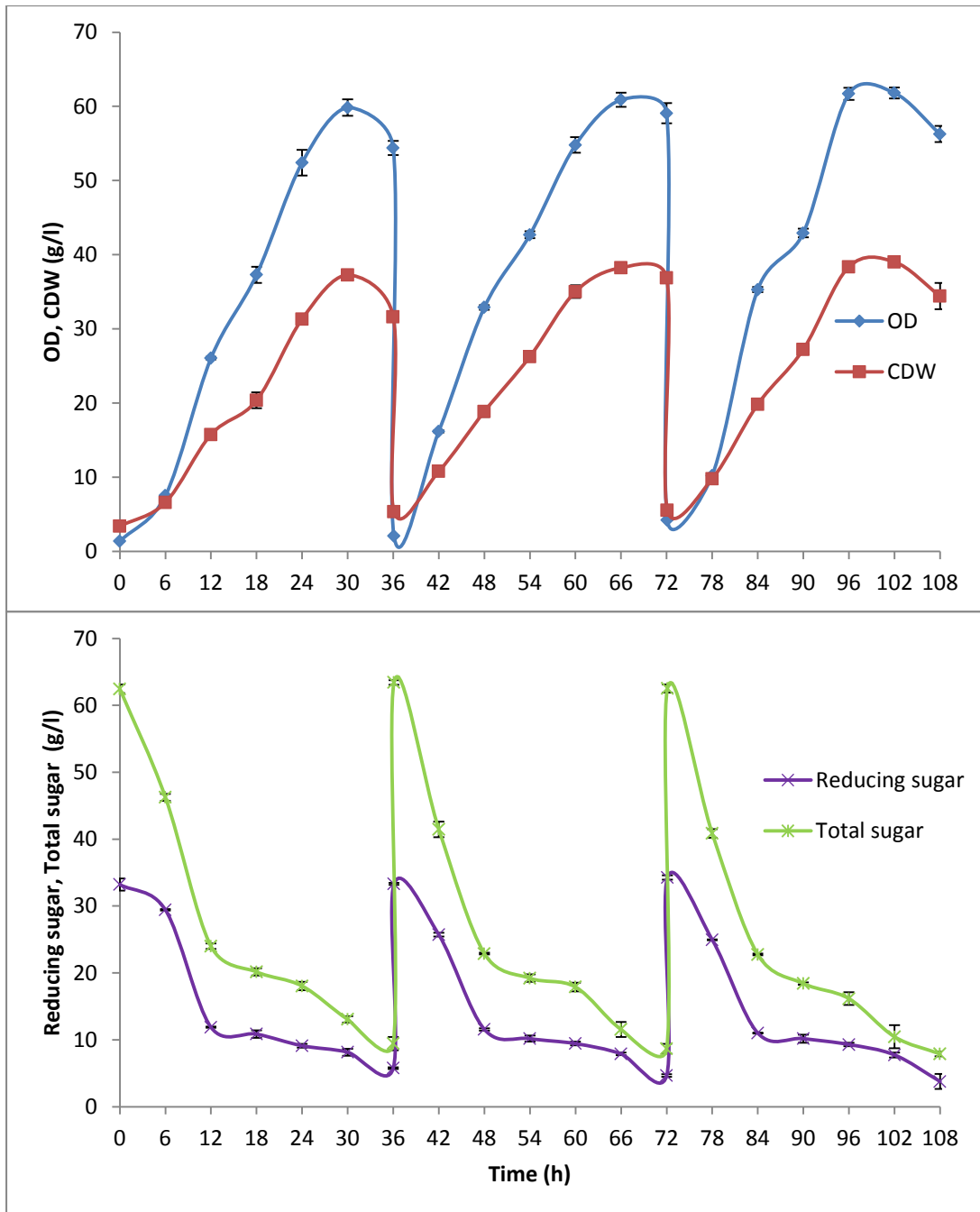
Yx/s คือ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

rx คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

rs คือ อัตราการใช้น้ำตาล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

2.2.2 *S. cerevisiae*

จากภาพที่ 4-25 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *S. cerevisiae* ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง ในสูตรอาหาร BPM ที่มีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมพีเอช ระหว่างการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4.5 อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบพัดเท่ากับ 600 รอบต่อนาที พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 1 เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในช่วง 0-30 ชั่วโมงแรก โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 37.27 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นเท่ากับ 59.85 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 62.46 กรัมต่อลิตร และลดลงเหลือเพียง 9.44 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 2 พบว่า การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-30 ชั่วโมงเท่านั้น มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 39.03 ความขุ่นเท่ากับ 60.90 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 63.42 กรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้นำพบว่ามีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 8.62 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ระยะคงที่และลดลงในชั่วโมงที่ 36 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 36.90 กรัมต่อลิตร และในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 3 มีลักษณะการเจริญที่คล้ายกับครั้งที่ 2 คือมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-30 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงลดลง มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 39.03 กรัมต่อลิตร ความขุ่นเท่ากับ 61.81 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 62.52 และลดลงจนเหลือ 7.89 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4-25 ผลการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บ ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 4-5 พารามิเตอร์การเจริญของ *S. cerevisiae* จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง

batch	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	r _x (g/L/h)	r _s (g/L/h)
1	37.27±0.21 ^a	0.23±0.02 ^a	0.72±0.00 ^a	1.19±0.01 ^a	3.21±0.08 ^a
2	38.23±0.92 ^b	0.28±0.01 ^b	0.73±0.01 ^a	1.38±0.03 ^b	3.38±0.03 ^b
3	39.03±0.35 ^c	0.26±0.01 ^b	0.78±0.01 ^b	1.52±0.01 ^c	3.31±0.06 ^{ab}

x คือ ปริมาณมวลเซลล์ คัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

Y_{x/s} คือ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

r_x คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

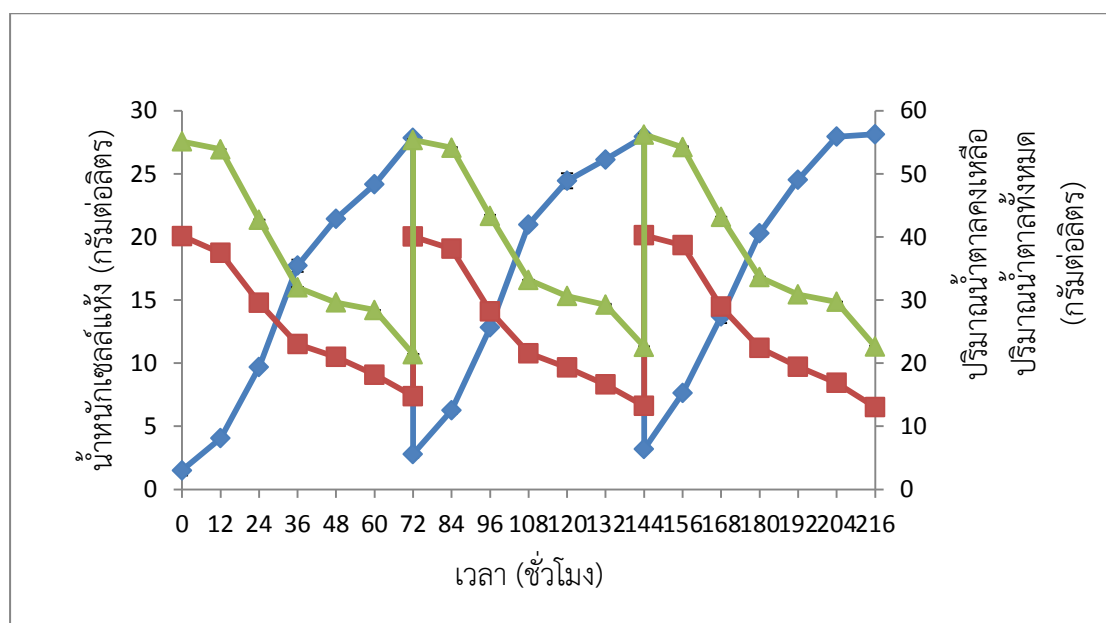
r_s คือ อัตราการใช้น้ำตาล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์การเจริญของ *S. cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง (ตารางที่ 4-4) พบว่า การเพาะเลี้ยงในแต่ละกะนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 37.27 38.23 และ 39.03 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.23 0.28 และ 0.26 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (Y_{x/s}) เท่ากับ 0.72 0.73 และ 0.78 อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 1.19 1.38 และ 1.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 3.21 3.38 และ 3.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

2.2.3 A. oryzae

จากภาพที่ 4-26 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญของ *A. oryzae* ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบหลายกะอย่างต่อเนื่อง ในสูตรอาหาร BPM ที่มีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ใช้เดกซ์ทรีนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมพีเอช ระหว่างการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 5.5 อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบพัด เท่ากับ 600 รอบต่อนาที พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 1 เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในช่วง 0-36 ชั่วโมงแรก โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 27.86 กรัมต่อลิตร มีค่าน้ำตาลเริ่มต้น เท่ากับ 55.12 กรัมต่อลิตร และลดลงเหลือเพียง 21.42 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 (สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1) หลังจากนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเข้าสู่การเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 2 พบว่า การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมงเท่านั้น มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 20.98 มีค่าน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 55.36 กรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้นับพบว่ามีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 22.95 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ระยะคงที่และลดลงในชั่วโมงที่ 72 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 27.95 กรัมต่อลิตร และในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ครั้งที่ 3 มีลักษณะการ

เจริญที่คล้ายกับครั้งที่ 2 คือมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงลดลง มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 28.13 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 56.21 และลดลงจนเหลือ 22.62 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4-26 ผลการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4-6 พารามิเตอร์การเจริญของ *A. oryzae* จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง

batch	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_s (g/L/h)	r_x (g/L/h)
1	27.86 ± 0.07	0.07	0.78	0.64	0.45
2	27.95 ± 0.06	0.06	0.77	0.62	0.51
3	28.13 ± 0.11	0.05	0.74	0.63	0.48

x คือ ปริมาณมวลเซลล์ คัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

s คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)

$Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อกรัม)

R_s คือ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

R_p คือ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์การเจริญของ *A. oryzae* ที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-
ต่อเนื่อง (ตารางที่ 4-6) พบว่า การเพาะเลี้ยงในแต่ละกะนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน มีค่ามวลเซลล์ (x)
เท่ากับ 27.86 27.95 และ 28.13 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.07 0.06 และ
0.05 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช่ไป (Y_{x/s}) เท่ากับ 0.78 0.77 และ 0.74 อัตราการ
สร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.45 0.51 และ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล
(r_s) เท่ากับ 0.64 0.62 และ 0.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบ

แหล่งคาร์บอน เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างผลผลิต ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนจึงมีความจำเป็น เดกซ์ทริน เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดหนึ่ง เป็นโอลิโกเมอร์ ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยจำนวนที่ไม่แน่นอนในแต่ละสาย โดยสามารถย่อยสลายได้เป็นกลูโคสผ่านการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งจากการค้นหาข้อมูลงานวิจัยอย่างละเอียด ยังไม่พบงานวิจัยใดนำเดกซ์ทรินมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเดกซ์ทรินกับกลูโคสในการเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิด พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) สำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* และ *A. oryzae* โดยมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทริน มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.81 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.29 กรัมต่อกรัม โดยเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการเจริญจำเพาะเพียง 0.52 ต่อชั่วโมง และผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.11 กรัมต่อกรัม และในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ด้วยเดกซ์ทริน โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.10 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.19 ต่อชั่วโมง ขณะที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าเดกซ์ทริน ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.73 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเพียง (μ) 0.16 ต่อชั่วโมง ในขณะที่การใช้เดกซ์ทรินในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่ากลูโคส มีอัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นเซลล์เท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยการใช้กลูโคส มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.31 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.35 กรัมต่อกรัม

การที่จุลินทรีย์ 3 ชนิดมีความสามารถในการเจริญด้วยอาหารที่มีเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกันชัดเจน เป็นผลมาจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของจุลินทรีย์ 3 ชนิดนี้ แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ *E. coli* และ *A. oryzae* สามารถเจริญในอาหารที่มีเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เพราะมีเอนไซม์ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. oryzae* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในระดับต้น ๆ ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จึงสามารถย่อยสลายเดกซ์ทรินออกเป็นกลูโคสโมเลกุลเดี่ยว เพื่อลำเลียงเข้าสู่ภายในเซลล์และนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม และการสร้างมวลเซลล์ได้ แต่ *S. cerevisiae* ไม่มีเอนไซม์ดังกล่าว ไม่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จึงไม่สามารถนำเดกซ์ทรินเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากเป็นสายโอลิโกเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้ไม่สามารถนำเดกซ์ทรินไปใช้ในเจริญเติบโต รวมถึงการสร้างผลิตภัณฑ์

ต่าง ๆ ได้ ดังนั้นเมื่อมีการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสลงในอาหาร เพื่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลายของเดกซ์ทรินเป็นกลูโคส ไปพร้อม ๆ กับกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จึงทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น อัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 0.24 ต่อชั่วโมง อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นเซลล์เท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงโดยพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) จากการเพาะเลี้ยงโดยไม่เติมเอนไซม์ และไม่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคส

ความเข้มข้นของเดกซ์ทรินต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบ

จากการศึกษาขั้นต้นพบว่า ความเข้มข้นที่ระดับแตกต่างกันของเดกซ์ทรินมีผลต่อการเจริญของ *E. coli* ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) คือ เมื่อความเข้มข้นของเดกซ์ทรินที่เพิ่มขึ้น จาก 20 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร และ 100 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณมวลเซลล์เพิ่มขึ้นในทุกๆระดับความเข้มข้น คือมีค่าเท่ากับ 9.27 18.63 และ 34.67 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.33 0.58 และ 0.47 ต่อชั่วโมง และ ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.36 0.40 และ 0.45 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ แต่ในกรณีของ *S. cerevisiae* เมื่อความเข้มข้นของเดกซ์ทรินเพิ่มขึ้นจาก 20 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) เพิ่มขึ้นจาก 8.07 กรัมต่อลิตร (อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.19 กรัมต่อกรัม) เป็น 34.13 กรัมต่อลิตร (อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.30 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.53 กรัมต่อกรัม) แต่เมื่อเพิ่มขึ้นเป็น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 32.60 กรัมต่อลิตร (อัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.19 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป เท่ากับ 0.41 กรัมต่อกรัม) ในขณะที่ *A. oryzae* เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 30 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณมวลเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 14.04 เป็น 27.07 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.08 และ 0.01 ต่อชั่วโมง และผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.73 และ 1.03 กรัมต่อกรัม แต่เมื่อความเข้มข้นเป็น 90 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 26.32 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.09 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม ดังนั้นเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมของเดกซ์ทรินในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน

ระดับความเข้มข้นของเดกซ์ทรินที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 3 ชนิด แตกต่างกัน เป็นผลมาจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของจุลินทรีย์ ดังที่กล่าวมาข้างต้น กล่าวคือ *E. coli* สามารถเจริญในอาหารที่มีเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า *S. cerevisiae* แม้จะอยู่ในสภาวะที่มีเดกซ์ทรินเข้มข้นมากถึง 100 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายเดกซ์ทรินได้ด้วยตัวเอง จะทำการปล่อยเอนไซม์มาย่อยสลายแบบค่อยเป็นค่อยไป ตามความต้องการใช้ที่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น แต่ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ใช้การเติมเอนไซม์จากภายนอก ปริมาณการย่อยเดกซ์ทรินไปเป็นกลูโคส จึงเกิดขึ้นตามความเข้มข้น

ของเอนไซม์ที่เติมลงไป ซึ่งอาจมากเกินไปจนเกินความต้องการใช้ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการสะสมจนมากเกินไป และกลายเป็นภาวะการจำกัดกลูโคส (Glucose Effect) ในที่สุด ซึ่งผลจากการทดลองดังกล่าวพบว่า การใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถใช้ได้ในความเข้มข้นที่มากกว่ากลูโคส ซึ่ง Riesenberg and Guthke (1991) และ Shiloach and Fass. (2005) รายงานไว้ว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* สามารถใช้ได้เพียง 50 กรัมต่อลิตร และ *S. cerevisiae* นั้นสามารถใช้ได้เพียง 30 กรัมต่อลิตร เท่านั้น โดยถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้จะก่อให้เกิดปัญหาการคั่งของคาร์บอน ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์

กรณี *A. oryzae* เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์ทรินจาก 30 เป็น 60 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการสร้างจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น แต่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นเป็น 90 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้การเจริญของ *A. oryzae* ลดลง เนื่องจาก *A. oryzae* มีการเจริญเติบโตเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous fungi หรือ mold) โดยเส้นใยที่เกิดขึ้นมักจะก่อให้เกิดความหนืดในอาหารเหลวในถังหมัก และยังเป็นอุปสรรคต่อการถ่ายเทออกซิเจน (ยูวพิน ด่านดุสิตาพันธ์, 2549) เมื่อออกซิเจนหรืออากาศไม่เพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ จึงทำให้เกิดการเจริญเติบโตที่ลดลง ดังที่กล่าวมาข้างต้นคือ *A. oryzae* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลจากการทดลองดังกล่าวพบว่า การใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถใช้ได้ในความเข้มข้นที่มากกว่ากลูโคส สอดคล้องกับ Fontana และคณะ, 2012 และ Malvessi, 2004 รายงานไว้ว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* สามารถใช้ได้เพียง 30 กรัมต่อลิตร เท่านั้น โดยถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้จะก่อให้เกิดปัญหาการคั่งของคาร์บอน ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ-ต่อเนื่อง ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต้นแบบ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ส่วนใหญ่นิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ซึ่งเป็นการเติมสารอาหารทีละน้อยเป็นระยะเวลานาน เพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลา แต่เนื่องจากมีกระบวนการที่ยุ่งยาก และการคำนวณอัตราการเจริญ ที่อาจไม่เหมาะสม ทำให้เกิดภาวะการขาดแคลนแหล่งอาหารหรือ การเจือจางที่มากเกินไป รวมไปถึงระยะเวลาที่นานในการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิดแบบกะ-ต่อเนื่อง ข้างต้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของการเพาะเลี้ยงในแต่ละกะ คือเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง *E. coli* เป็นเวลาทั้งสิ้น 36 ชั่วโมง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละกะ เท่ากับ 37.30 32.20 และ 31.80 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่าความสามารถในการผลิต (Productivity) เท่ากับ 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งผลการเพาะเลี้ยงดังกล่าวสามารถเทียบเคียงกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการแบบเติมกะของ Paalme et al. (1990) ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* ใช้เทคนิคการเติมสารอาหารโดยการควบคุมอัตรา

การเจริญจำเพาะ (Specific Growth-Rate Control) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์ได้ 53.00 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 21 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 2.50 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ Lee and Chang (1993) ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ใช้เทคนิคการเติมสารอาหารแบบ pH-stat ซึ่งทำให้ได้เซลล์เท่ากับ 105.40 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 36 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 2.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

และกรณีการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* เป็นเวลาทั้งสิ้น 108 ชั่วโมง มีค่าหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 37.27, 38.23 และ 39.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) ในการเพาะเลี้ยงแต่ละกะ คิดเป็นค่าความสามารถในการผลิตเซลล์ เท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ เช่น Kim et al. (2007) ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอัตราการเติมสารอาหารเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์ 95.70 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 80 ชั่วโมงคิดเป็นความสามารถในการผลิตเซลล์เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ในส่วนการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 216 ค่าหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ ชั่วโมง 27.86 27.95 และ 28.13 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเซลล์เท่ากับ 0.388 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงซึ่งมีค่าการผลิตเซลล์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture เช่นเดียวกัน

จากภาพกราฟที่แสดงผลของปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น ภาพที่ 4-24 4-25 และ 4-26 จะแสดงให้เห็นถึงช่องว่างที่เกิดขึ้นระหว่างเส้นกราฟสองเส้น ที่มีลักษณะของช่องว่างที่ค่อย ๆ ลดลง (แคบลง) ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ทั้งนี้เป็นผลจากความยาวของสายโพลิเมอร์ ที่ค่อย ๆ เล็กลงเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นอกจากนี้พบว่าความยาวสายโพลิโเมอร์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สามชนิดมีความแตกต่างกัน คือ สายโพลิโเมอร์ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* และ *A. oryzae* จะเริ่มต้นด้วยสายที่มีความยาวมาก จากนั้นความยาวของสายเริ่มลดลง (ช่องว่างระหว่างเส้นกราฟในช่วงแรกมีมาก จากนั้นช่องว่างนั้นค่อย ๆ ลดลง) ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นไปแบบค่อยเป็นค่อยไป ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ซึ่งมีการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเห็นการย่อยสลายสายโพลิโเมอร์อย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง (ช่วงห่างของเส้นกราฟมีมากในช่วงต้นเท่านั้น จากนั้นเริ่มแคบลงอย่างรวดเร็ว) ทำให้เกิดเป็นปริมาณกลูโคสที่มากเกินไปความต้องการใช้ของเซลล์

ประสิทธิภาพของวิธีการทดลองต่อจุลินทรีย์ต้นแบบ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีดังกล่าว คือ การเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะต่อเนื่อง ติดต่อกัน 3 กะ โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าให้ผลที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* และ *S. cerevisiae* มากกว่าการเพาะเลี้ยง *A. oryzae*

เนื่องจากให้ปริมาณมวลเซลล์ที่สูงกว่า นอกจากนี้ยังเห็นได้จากอัตราการเจริญจำเพาะ *E. coli* มีค่าเท่ากับ 0.47 ต่อชั่วโมง *S. cerevisiae* มีค่าเท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมง และ *A. oryzae* มีค่าเท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมง

ทั้งนี้ เป็นผลมาจาก ปัจจัยหลักได้แก่ความสามารถในการย่อยสลายเดกซ์ทริน เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ ซึ่ง *E. coli* สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสได้ด้วยตนเอง จึงเกิดการย่อยสลายเดกซ์ทรินอย่างช้า ๆ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ของเซลล์ แต่ *S. cerevisiae* ต้องอาศัยเอนไซม์จากภายนอก ซึ่งการทำงานไม่ได้สัมพันธ์กับความต้องการใช้ของเซลล์ แต่เป็นความสัมพันธ์กับปริมาณและประสิทธิภาพของเอนไซม์เอง รวมถึงปริมาณเอนไซม์ที่ใส่ลงไปยังไม่มีการหาค่าที่เหมาะสม ที่สามารถทำงานได้อย่างพอดีกับความต้องการใช้ของเซลล์ ดังนั้นการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก เกินความต้องการใช้ของเซลล์ จึงเกิดปัญหาการคั่งของกลูโคสตามมา แต่ถึงแม้ว่า *A. oryzae* จะสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสได้เอง แต่ยังคงมีผลผลิตน้อย เนื่องจากในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบน้ำ มีการสร้างเส้นใยที่มีความอมน้ำ จึงทำให้การการกวนผสม และการถ่ายเทออกซิเจนไม่มีประสิทธิภาพดี เซลล์จึงยังไม่มี การเจริญเติบโตดีเท่าที่ควร

ตารางที่ 5-1 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ของจุลินทรีย์ต้นแบบ 3 ชนิด

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	เวลา (h)	ความสามารถในการผลิตเซลล์ (g/L/h)	อ้างอิง
<i>E. coli</i>	กลูโคส	53.00	21	2.50	Paalme et. al.,1990
<i>E. coli</i>	ซูโครส	105.40	36	2.92	Lee & Chang, 1993
<i>E. coli</i>	เดกซ์ทริน	107.77	36	2.88	Kwanruthai, 2003
<i>S. cerevisiae</i>	กากน้ำตาล	95.70	80	1.20	Kim et al., 2007
<i>S. cerevisiae</i>	เดกซ์ทริน	114.53	108	1.06	Kwanruthai, 2003

สรุปผลการทดลอง

1. สูตรอาหาร BPM มีความประสิทธิภาพที่ดีในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิดได้ ต่อเมื่อมีการเติมยีสต์สกัดเพื่อเป็นแหล่งสารอาหารเสริม ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานได้ ในการเพาะเลี้ยงระดับใหญ่ เนื่องจากเป็นสูตรอาหารชนิด Defind Medium มีราคาถูกและสามารถควบคุมคุณภาพในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้

2. เดกซ์ทรีนมีประสิทธิภาพที่ดี ความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยง *E. coli* และ *A. oryzae* แต่ในกรณีของ *S. cerevisiae* ต้องมีการเติมเอนไซม์กลูโคสไมเลส ที่มีความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียสได้ร่วมด้วย เนื่องจากไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ด้วยตัวเอง แต่อย่างไรก็ตามการเติมเอนไซม์ ก็ยังก่อให้เกิดปัญหาการคั่งของกลูโคสในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการย่อยสลายของเอนไซม์เกิดขึ้นเร็วกว่าความต้องการใช้ของเซลล์

3. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคแบบกะ พบว่าสามารถใช้เดกซ์ทรีนได้มากถึง 100 กรัมต่อลิตร สำหรับ *E. coli* และ 60 กรัมต่อลิตร สำหรับ *S. cerevisiae* และ *A. oryzae* ซึ่งพบว่าเป็นความเข้มข้นที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสซึ่งสามารถใช้ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของการใช้เดกซ์ทรีนที่ปรากฏในการวิจัยครั้งนี้

4. การเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสามชนิด ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง 3 กะสามารถให้สร้างผลผลิตมวลเซลล์ความเข้มข้นสูงได้ เทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ หรือแบบต่อเนื่อง จากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งกล่าวไว้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคกะ-ต่อเนื่องนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่ใช้จุลินทรีย์ต้นแบบสองชนิดนี้เป็นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ และต้องการเซลล์ความเข้มข้นสูง

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2559A10802049 สัญญาเลขที่ 90/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ต้นแบบ 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสูงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะลำดับต่อเนื่องอย่างเข้มข้น (High-Cell-Density Cultivation of Three Model Microorganisms with Intensively Multiple Sequential Batch Technique)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน เดือน ปี) 19 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ (วัน เดือน ปี) 25 มิถุนายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี 9 เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน เดือน ปี) 19 ตุลาคม 2558

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	470,250	บาท	เมื่อ วัน เดือน ปี	14 มกราคม 2559
งวดที่ 2 (40%)	376,200	บาท	เมื่อ วัน เดือน ปี	20 กันยายน 2559
งวดที่ 3 (10%)	94,050	บาท	เมื่อ วัน เดือน ปี	กรกฎาคม 2562
รวม	940,500			

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	196,800	196,800	0
2. ค่าจ้าง	114,645	114,645	0
3. ค่าวัสดุ	440,005	440,005	0
4. ค่าใช้สอย	95,000	95,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (ค่าบำรุงสถาบัน)	94,050	94,050	0
รวม	940,500	940,500	0

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

- ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และ เศรษฐวิชัย ฉ่ำศาสตร์. (2557) การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะต่อเนื่อง. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. มีนาคม 2557.
- ฉวีวรรณ สว่างวัน. (2548). การสลายแป้งมันให้เป็นน้ำตาลในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2549). ยีสต์ : ความหลากหลายทางเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Agger, T., Spohr, A. B., & Nielsen, J. (2001). Alpha-amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans*. *Appl Microbial Biotechnol*, 55 (1), 81-84.
- Biener, R., Steinkamper, A., & Hoffman, J. (2010). Calorimetric control for high cell density cultivation of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology*, 146, 45-53.
- Chi, Z., & Arneborg, N. 2000, *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 75-78.
- Dong, Y., Yang, Q., Jia, S., & Qiao C. (2007). Effect of pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 226-230.
- Faulkner E. (2006). Use of fed-batch cultivation for achieved high cell density cultivation for the pilot scale production of a recombinant protein (phenylalanine Dehydrogenase) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Progress*, 22, 889-897.

- Fuchs, C., Koster, D., Wiebusch, S., Marh K., Esbrenner, G., & Markl, H. (2002). Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 93, 243-251.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, Y.K., & Chang, H.N. (2004). High-cell-density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 147-150.
- Kim, H.Y., Kang, S.W., Lee, J. H., Chang H. I., Yum, C.W., Paik, H. D., Kang, C. W., & Kim, S. W. (2007). High cell Density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production in bata-glucan. *Journal of Industrial and Engineering*, 13(1), 153-158.
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., & Deckwer, W. D. (2002). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 39, 59-65.
- Lee, S. Y. (1996). High cell density culture of *Escherichia coli*. *libtech March*, 14, 98-103.
- Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1995). Production of poly (hydroxyalkanoic acid). *Advances Biochemistry and. Engineering Biotechnol*, 52, 27-58.
- Life science foundation. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* genome. Retrieve from http://www.lifesciencesfoundation.org/events/The_Saccharomyces_cerevisiae_genome.html
- Lui, Y. C., Liao, L.C., & Wu, W. T. (2000). Culture of recombinant *Escherichia coli* to achieve high cell density with a high level of penicillin G Acylase activity. *Programs of National Science Council*, 24 (4), 156-160.

- Masui, T., Sato, H., Yamamuro, H., Misawa, S., Shinsato, N., Masuda, H., Takahashi, J., & Sato, S. (2008). High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for hirudin variant 1 production. *Journal of Biotechnology*, 134 (1-2), 88-92.
- Masui, T., Shinsato, N., Yokota H., Takahashi, J., & Sato, S. (2006). High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* with pressurized culture. *Process Biochemistry*, 41, 920-924.
- Masui, T., Yokota, H., Mukataka, S., & Takahashi, J. (1989). Pressurized culture of *Escherichia coli* for a high concentration. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(8), 2115- 2120.
- Matthew, B. (2012, 28 September). The small scale. Retrieved from <http://earthspared.org/?p=224>
- Mimage. (2006). Role of mitochondria in conserved mechanism of ageing. Retrieved from http://www.mimage.unifrankfurt.de/modelsystems/saccharomyces_cerevisiae_ms01.htm
- Riesenberg, D., & Guthke, R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganism. *Apply Microbial Biotechnol*, 51, 422-430.
- Rja, A. E., Kumar, H. S. S., Kumar, S. U., Misra, M. C., & Ghildyal, N. P. (2002). High-cell-density fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol. *Biotechnol Progress*, 18, 1130-1132.
- Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density – A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23(5), 345-357.
- Shojaosadati, S. A., Kolaei S. M. V., Balaeipour, V., & Farroul, A. M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6(2), 63-83.

- Suzuki, T., Yamane, T., & Shimizu, S. (1987). Mass production of thiostepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat model feeding of multi-substrate. *Applied Microbial Biotechnology*, 25, 526-531.
- Werner, R. (2004). Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals. *Journal of Biotechnology*, 113, 171-182.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient Broth (NB)

ส่วนประกอบ

อาหาร NA สำเร็จรูป 28.0 กรัมต่อลิตร

pH 7.0 ± 0.1

นำอาหาร NB สำเร็จรูป ละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอช แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Yeast Peptone Dextrose (YPD)

ส่วนประกอบ

Yeast Extract 10 กรัมต่อลิตร

Peptone 20 กรัมต่อลิตร

Glucose 20 กรัมต่อลิตร

pH 5.5 ± 0.1

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ปรับพีเอชแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Potato Dextrose agar (PDA)

อาหาร PDA สำเร็จรูป 39.0 กรัมต่อลิตร

pH 3.5 ± 0.1

นำอาหาร NB สำเร็จรูป ละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอช แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Batch Production Medium (BMP)

ส่วนประกอบ

แหล่งคาร์บอน	20	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.2	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	1.8	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัมต่อลิตร
Trace Element Solution	1	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ปรับพีเอชตามความต้องการของจุลินทรีย์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศา 15 นาที

* ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารที่ความเข้มข้นมากขึ้น สามารถทำได้โดยนำส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ แหล่งคาร์บอนที่ต้องแยกใส่ภาชนะอื่น เพื่อป้องกันการเกิดสารประกอบในขณะฆ่าเชื้อ และทำให้เกิดการเปลี่ยนสีและสภาพของอาหาร) มาละลายในน้ำกลั่น ให้ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 1 ลิตร นำส่วนประกอบทั้งหมดไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

5. การเตรียม Trace Element

ส่วนประกอบ

แอมโมเนียมเพอร์ซิเตรท	6	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์	10	กรัมต่อลิตร
บอริกแอซิด	0.3	กรัมต่อลิตร
โคบอลคลอไรด์	0.2	กรัมต่อลิตร
ซิงค์เฟต	0.1	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์	0.03	กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดต	0.03	กรัมต่อลิตร
นิกเกิลซัลเฟต	0.02	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.01	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดแยกละลายในน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1 ลิตร แห่เย็นจนกว่าจะใช้ผสมกับอาหาร production medium ในการเตรียมนิยามเตรียมที่ความเข้มข้นประมาณ 10 เท่า

6. การเตรียม 4 N NaOH

ใช้สำหรับควบคุมค่า pH ของการเพาะเลี้ยง มีวิธีการคือ

- 5.1 ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 160 กรัม
- 5.2 ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร
- 5.3 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเก็บใส่ขวดเพื่อนำมาใช้ต่อไป

7. การเตรียม 2 N HCl

ใช้สำหรับควบคุมค่า pH ของการเพาะเลี้ยง มีวิธีการคือ

- 6.1 ตวงกรดไฮดรอกลิคเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 166 มิลลิลิตร
- 6.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร
- 6.3 เก็บใส่ขวดเพื่อนำมาใช้ต่อไป

8. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร
เติมสารละลายต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ที่ละน้อย คนให้เข้ากัน นำไปอุ่นในน้ำร้อนจนสารละลายใส เติมโพแทสเซียมทาทาเทรต 300 กรัมตามลำดับ ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ค้างคืนก่อนนำมาใช้งาน

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่	ปริมาณสารละลายกลูโคส (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

9. การย่อยเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง

การย่อยเดกซ์ทรินในการวิจัยครั้งนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีการย่อยแป้งของ ฉวีวรรณ สว่างวัน (2548) โดยมีสถานะในการย่อยดังนี้

1. เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือ สำหรับการย่อยแป้งได้แก่ ถังย่อยแป้งขนาด 5 ลิตรที่มี Jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิ ปัม สายยางซิลิโคน อ่างควบคุมอุณหภูมิ มอเตอร์และใบพัดสำหรับการกวนผสม (ภาคผนวก ข)
2. ติดตั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้พร้อมใช้งาน โดยตั้งค่าอุณหภูมิอ่างควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส ต่อเข้ากับ Jacket ของถังย่อยแป้ง ใช้อัตราการกวนผสมของใบพัดเท่ากับ 400 รอบต่อนาที
3. เติมน้ำในถังย่อยแป้งส่วนหนึ่ง รองอุณหภูมิในถังได้ประมาณ 70 องศาเซลเซียส ทำการเติมเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) รหัส GC 358 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากนั้นค่อย ๆ เติมแป้งมันสำปะหลังจนหมด (ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปรับปริมาตรจนครบตามที่ต้องการ
4. รองอุณหภูมิเท่ากับ 95 องศาเซลเซียสจึงเริ่มจับเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สารละลายเดกซ์ทริน ซึ่งจะมีลักษณะเป็นของเหลวที่มีความหนืดเล็กน้อย เป็นสีส้มขุ่น (ภาพภาคผนวก ก-1)



ภาพภาคผนวก ก-1 สารละลายเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

10. การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง

การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง เป็นกระบวนการที่ทำต่อจากการย่อยเดกซ์ทริน โดย

1. หลังจากที่ได้สารละลายเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งในข้อ 8 แล้วทำการลดอุณหภูมิภายในถังย่อยแป้งจนเหลือ 60 องศาเซลเซียส
2. จากนั้นทำการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส รหัส GC 140 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v)
3. ทำการกวนผสมต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายกลูโคสที่มีลักษณะหนืดเล็กน้อย สีเหลืองใส (ภาพภาคผนวก ก-2)



ภาพภาคผนวก ก-2 สารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส