สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยการใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง

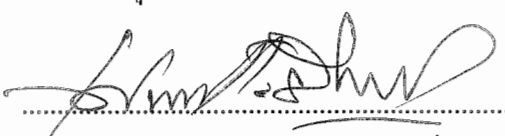
มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

12 มิ.ย. 2556
323054

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2556
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ขวัญฤทัย มาลัยเรือง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



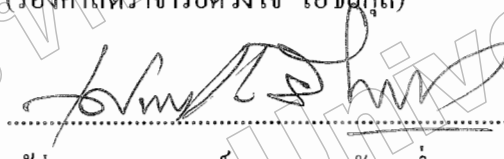
.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)



.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

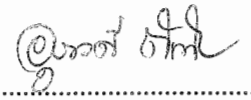
.....กรรมการ

(ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

.....กรรมการ

(ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)

วันที่ 19 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2556

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล และดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์ กรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง เหมาะสม และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายอำนวย มาลัยเรือง นางจุฑาทิพย์ มาลัยเรือง และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนทั้งด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ด้วยดีตลอดมา

ขอบคุณ นายมรกต กระจ่าง ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการวิจัย ร่วมถึง นางสาวชนิกานต์ เพรชงาม นายชุษณะ สารจิตภาพ นางสาวจารุวรรณ ศรีเส็ง และเพื่อน ๆ หลายคน ที่แวะเวียนมาให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจในระหว่างทำการวิจัย

คุณค่าทั้งหลายที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทีแด่บิดามารดา และบูรพาจารย์ที่เคยอบรมสั่งสอน ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

52910147: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง/ การเพาะเลี้ยงแบบกะต่อเนื่อง

ขวัญฤทัย มาลัยเรือง: การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยการใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง (HIGH-CELL-DENSITY BATCH CULTIVATION USING HIGH CONCENTRATION CARBON SOURCE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, Ph.D. 84 หน้า. ปี พ.ศ. 2556.

การวิจัยครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาการผลิตเซลล์ต้นแบบ (*E. coli* และ *S. cerevisiae*) ความเข้มข้นสูง ด้วยสูตรอาหาร BPM โดยใช้โอลิโกเมอร์ของกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ทริน) ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบางอย่างเพื่อสามารถขยายขนาดนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ทำการศึกษาศักยภาพของอาหารสูตร BPM โดยการใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* และ 60 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยง *S. cereviasiae* โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) ในสภาวะให้อากาศ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะต่อเนื่อง (Sequential Batches) ในระดับถังหมักขนาดบรรจุ 5 ลิตร พบว่าสูตรอาหาร BPM มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะเมื่อมีการเติมยีสต์สกัด ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าการใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพกว่าการใช้กลูโคส *E. coli* มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 37.30, 32.20 และ 31.80 กรัมต่อลิตร ด้วยการหมักแบบสามกะต่อเนื่องในเวลา 36 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตเซลล์สูงถึง 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ย เท่ากับ 0.47 ต่อชั่วโมงและ อัตราการใช้น้ำตาลเฉลี่ยเท่ากับ 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 ซึ่งสูงเทียบเคียงได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch) ทั่วไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

52910147: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)

KEYWORDS: HIGH-CELL-DENSITY CULTIVATION/ SEQUENTIAL BATCH CULTIVATION

KWANRUTHAI MALAIRUANG: HIGH-CELL-DENSITY BATCH CULTIVATION USING HIGH CONCENTRATION CARBON SOURCE. ADVISORY COMMITTEE: SEATHAWAT CHAMSART, Ph.D. 84 P. 2013.

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* was studied using aerobic batch cultivation. The use of technique sequential batches 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.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ที่มาและความสำคัญ..... 1

วัตถุประสงค์การวิจัย..... 2

สมมติฐานการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

กรอบแนวคิดการวิจัย..... 3

ขอบเขตการวิจัย..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง..... 5

วิธีการและเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง..... 8

แหล่งคาร์บอน..... 14

จุลินทรีย์ต้นแบบ..... 16

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 21

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 25

วัสดุอุปกรณ์..... 25

สารเคมี..... 26

สูตรอาหาร..... 26

จุลินทรีย์ที่ใช้และสภาวะการเพาะเลี้ยง..... 27

วิธีการทดลอง..... 27

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการวิจัย	33
	ผลการศึกษาประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ	33
	ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเดกซ์ทริน ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ	42
	ผลการศึกษาการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นสูง ที่ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ	50
	ผลการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ-ต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร	62
5	อภิปราย และสรุปผล	67
	อภิปรายผล	67
	สรุปผล	72
	ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม		74
ภาคผนวก		77
	ภาคผนวก ก	78
ประวัติย่อของผู้วิจัย		84

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1พารามิเตอร์การเจริญของ *E. coli* จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน..... 53

4-2พารามิเตอร์การเจริญของ *S. cerevisiae* จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน..... 59

4-3พารามิเตอร์การเจริญของ *E. coli* จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง..... 64

4-4พารามิเตอร์การเจริญของ *S. cerevisiae* จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง.... 66

5-1เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของจุลินทรีย์ต้นแบบ 2 ชนิด.. 72

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1-1 กรอบแนวคิดการวิจัย..... 3

2-1 โครงสร้างโมเลกุลของเดกซ์ทริน..... 15

2-2 โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคส..... 16

2-3 ลักษณะเซลล์ *E. coli*..... 16

2-4 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae*..... 18

4-1 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยสูตรอาหาร NB..... 34

4-2 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยสูตรอาหาร BPM..... 34

4-3 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยสูตรอาหาร BPM เติมยีสต์สกัด..... 35

4-4 เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ สูตรอาหาร NB, BPM และสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด..... 37

4-5 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยสูตรอาหาร YPD..... 38

4-6 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยสูตรอาหาร BPM..... 39

4-7 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยสูตรอาหาร BPM เติมยีสต์สกัด..... 40

4-8 เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ สูตรอาหาร YPD, BPM และสูตรอาหาร BPM ที่เติมยีสต์สกัด..... 41

4-9 การเพาะเลี้ยง *E. coli* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 42

4-10 การเพาะเลี้ยง *E. coli* โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน..... 43

4-11 เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยง *E. coli* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ กลูโคส และเดกซ์ทริน..... 44

4-12 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 46

4-13 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้เดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน..... 46

4-14 เพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้เดกซ์ทรินร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 47

4-15 เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส เดกซ์ทริน และเดกซ์ทรินร่วมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส..... 49

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-16 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร..... 51

4-17 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร..... 51

4-18 การเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร..... 52

4-19 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร..... 55

4-20 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร..... 57

4-21 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร..... 57

4-22 การเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร..... 58

4-23 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร..... 61

4-24 ผลการเพาะเลี้ยง *E. coli* ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง 3 กะ..... 63

4-24 ผลการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยเทคนิคแบบกะ-ต่อเนื่อง 3 กะ..... 65

ก-1 สารละลายเดกซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส..... 82

ก-2 สารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส..... 83

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University