บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง (HCDC: High-Cell Density Cultivation)

วัตถุประสงค์ที่สำคัญของการหมัก (Fermentation) หรือการเพาะเลี้ยง (Cultivation) 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 อินเตอร์เฟอร์รอน (Interferon) อินเตอร์ลูคิน (Interleukins) โคโลนี สติมูเลติง แฟคเตอร์ (Colony Stimulating Factor) และฮอร์โมนที่มีผลต่อการเจริญเติบโต (Growth Hormone) ให้มีปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการใช้ของมนุษย์ในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ อาหาร และอื่น ๆ ได้ (Shojaosadati et al., 2008) ซึ่งหากอาศัยการผลิตจากแหล่งธรรมชาติเพียงอย่างเดียวคงเป็นไปในยาก หรือไม่สามารถเป็นไปได้ ที่จะเพียงพอต่อความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านั้น จึงทำให้ในปัจจุบัน การศึกษาวิจัย ทางด้านการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ความเข้มข้นสูงได้รับความสนใจมากในการนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่าง ๆ

ความหมาย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง หมายถึง วิธีการเพาะเลี้ยงหรือการหมักแบบหนึ่งที่สามารถทำให้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก มีอัตราการเจริญเติบโต และการสะสมของเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงได้สำเร็จ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบนี้เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อทำให้จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีการผลิตและสะสมผลิตภัณฑ์ รวมไปถึงมีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ในปริมาณที่สูงได้ โดยใช้หลักแนวคิดที่ว่าปริมาณของผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่สร้างได้ขึ้นอยู่กับ 1) ความเข้มข้นของเซลล์ และ 2) ความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ (Fuchs et al., 2001) คือ หากขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์ของเซลล์นั้น เซลล์จะต้องมีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อเซลล์หนึ่งเซลล์ได้สูง ซึ่งหากต้องการพัฒนาในด้านนี้ ต้องมีการศึกษาลึกถึงระดับยีนอาศัยความรู้ทางด้านการตัดต่อยีน โดยค้นหาและปรับเปลี่ยนยีน โปรโมเตอร์ (Promoter) หรือตัว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เหนี่ยวนำในการแสดงออกของผลิตภัณฑ์ ให้ยีนนั้นสามารถแสดงออกได้มากขึ้น ต้องอาศัยระยะเวลาที่ยาวนาน รวมไปถึงต้องใช้ความละเอียดในการศึกษาวิจัยอย่างมาก แต่หากขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์นั้น หมายถึง ผลิตภัณฑ์จะเพิ่มมากขึ้นถ้าเซลล์มีความเข้มข้นสูง (ได้แก่ ปริมาณการสร้างผลิตภัณฑ์ต่อน้ำหนักต่อเซลล์ต่อเวลา) ดังนั้นการพัฒนาในส่วนนี้จะสามารถทำได้โดยการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งในส่วนการพัฒนาสูตรอาหาร สภาวะการเพาะเลี้ยง และวิธีการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง

โดยทั่วไปวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงนิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารชีวภาพ ที่มีความต้องการใช้ หรือมีความจำเป็นในด้านต่าง ๆ ทั้งที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ อุตสาหกรรมทางด้านการแพทย์ และอื่น ๆ ให้สามารถผลิตได้ในปริมาณมากจนเข้าสู่ขั้นอุตสาหกรรมได้ จึงกล่าวได้ว่าวิธีการนี้เป็นอีกทางหนึ่งที่มีการพัฒนาขึ้นมาเพื่อตอบสนองความเจริญก้าวหน้าของเศรษฐกิจและอุตสาหกรรม

ประวัติความเป็นมา

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงเริ่มมีการนำมาใช้ในครั้งแรก สำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein) เอทานอล และมวลชีวภาพ ต่อมาได้มีการพัฒนาขึ้นสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม มีโซไฟล์ (Mesophiles) ชนิดต่าง ๆ ให้มีเซลล์ความเข้มข้นสูงเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ *Streptomycetes* ให้ได้ความเข้มข้นสูงเพื่อผลิตยาปฏิชีวนะในปริมาณสูง (Suzuki et al., 1987) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม เมทิลโลโทรป (Methylotrope) ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดโพลิไฮดรอกซีแอลคาโนอิก (Polyhydroxyalkanoic) (Lee & Chang, 1995) รวมไปถึงมีการนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนมนุษย์โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ *E. coli* โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการนำเสนอถึงข้อดี และสรุปการใช้กลวิธีทางโมเลกุลร่วมกับเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงว่า สามารถผลิตให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงมาก ๆ ได้สำเร็จ จึงเหมาะกับการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนซ์โปรตีนได้เป็นอย่างดี และล่าสุดพบว่าสามารถประยุกต์ใช้และประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่ม เอกทรีโมไฟล์ (Extremophiles) ได้แก่ เทอร์โมไฟล์(Thermophiles) เทอโมอะซิโดไฟล์ (Thermoacidophiles) และฮาโลไฟล์ (Halophiles) ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงได้เป็นอย่างดีด้วย (Riesenberg & Guthke, 1999)

นอกจากนี้งานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงในอนาคตยังต้องมีการศึกษาต่อไปอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะเกิดขึ้นมาใหม่จากกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมไปถึงเพื่อรองรับความต้องการของอุตสาหกรรมที่มีความต้องการให้มีกระบวนการที่แน่นอนสำหรับควบคุมการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์ความเข้มข้นสูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อดีและประโยชน์

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

ข้อเสียและปัญหา

นอกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบความเข้มข้นสูงมีข้อดีแล้ว ยังมีข้อเสียหลายข้อด้วยเช่นกัน คือ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้อาจทำให้สารตั้งต้น (Substrate) จำกัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เอง หากมีการเติมสารตั้งต้นในปริมาณที่มากเกินพอ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการจำกัดในเรื่องของการให้อากาศและการส่งถ่ายออกซิเจนภายในระบบการเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์มีความต้องการใช้ออกซิเจนมาก ทำให้เกิดเป็นสภาวะขาดแคลนออกซิเจนและอาจเข้าสู่สภาวะการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic)ได้ บางครั้งเซลล์ที่มากเกินไปอาจเกิดการทำลายตัวเองด้วยกระบวนการ เซลล์ไลซิส (Cell Lysis) และ โปรติโอไลติก (Proteolysis) นอกจากนี้ความเข้มข้นของเซลล์ที่มากขึ้นจะทำให้อัตราเมทาบอลิซึมที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดความร้อนขึ้นภายในระบบมาก ส่งผลให้การส่งถ่ายความร้อนภายในถังก็จะมีประสิทธิภาพลดลง รวมไปถึงมีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้นด้วย ซึ่งสิ่งที่เกิดขึ้นเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ หรือมีการเปลี่ยนรูปผลิตภัณฑ์ไป เนื่องจากการเปลี่ยนวิถีการเมทาบอลิซึม เช่นมีการสร้างผลพลอยได้ (By Product) เป็นต้น (Shojaosadati et al., 2008)

ในการทดลองทั่วไปจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ปัญหาที่สำคัญ คือ การขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งส่งผลกระทบไปถึงปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ การสร้างผลพลอยได้ ที่ซึ่งเป็นตัวไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นต้น ซึ่งปัญหานี้เกิดจากระบบการถ่ายเทออกซิเจนของถังหมักที่มีขายอยู่ในปัจจุบันนั้นมีข้อจำกัด โดยไม่สามารถให้อากาศได้เพียงพอกับการเจริญของเซลล์ที่มีค่าความเข้มข้นสูงได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการและเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง (Shojaosadati et al., 2008)

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลัก ๆ ได้แก่การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) แบบเติมกะ (Fed-Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) ซึ่งแต่ละชนิดมีวิธีการ การควบคุม รวมไปถึงระยะเวลาในการดำเนินการที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งในการเลือกนำมาใช้นั้นต้องใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการตัดสินใจ เช่นชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ผลผลิตที่ต้องการ รวมไปถึงเทคนิคต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้กระบวนการเพาะเลี้ยงนั้นมีประสิทธิภาพดีมากขึ้น

การเพาะเลี้ยงแบบกะ

การเพาะเลี้ยงแบบกะ เป็นการเพาะเลี้ยงโดยทำการเตรียมอาหารเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เซลล์จะใช้สารตั้งต้นต่าง ๆ ได้จากสารอาหารเริ่มต้นเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เนื่องจากหลังจากการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นไปแล้วนั้น จะไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เข้าไปอีก รวมถึงจะไม่มีการนำสิ่งใดออกระหว่างการหมักด้วย ซึ่งจะทำการเก็บน้ำหมักทั้งหมดเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เมื่อครบกำหนดเวลาการหมักที่กำหนดไว้ กล่าวได้ว่าในการหมักแบบเบ็ดเสร็จแต่ละครั้งนั้นต้องมีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นใหม่ในทุก ๆ ครั้ง การหมักแบบนี้เป็นที่นิยมมากในโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังหมักสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก มีระบบการกวนเพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึง มีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อเข้าสู่กระบวนการเก็บเกี่ยวในขั้นต่อไป

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาตรไม่มากนัก
2. เชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงจะมีความแข็งแรง เนื่องจากการใช้หัวเชื้อที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการผ่าเหล่า (Mutation) ได้ยากด้วย
3. การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย เนื่องจากไม่มีการเปิดระบบเพื่อนำสารอาหารเข้าหรือออก เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ภายนอกจึงเข้าสู่ระบบได้ยาก
4. การควบคุมทำได้ง่ายไม่สลับซับซ้อน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้อุปกรณ์ในการดำเนินการน้อยมาก

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. ต้องเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นและวัตถุดิบต่าง ๆ ใหม่ทุกครั้งที่ดำเนินการหมัก ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ต้องเสียเวลารอเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง เนื่องจากเป็นหัวเชื้อที่เตรียมใหม่ จึงต้องมีการปรับสภาวะของจุลินทรีย์ ให้สามารถใช้อาหารได้

การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

การหมักแบบเติมกะ เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วง ๆ หลังจากที่ใส่หัวเชื้อเริ่มต้นแล้ว โดยไม่มีการถ่ายออก ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบกะตรงที่ปริมาตรอาหารในการหมักแบบเติมกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเติมกะนั้น ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่าง ๆ มากที่สุด เช่น การผลิตเพนนิซิลิน การผลิตยีสต์ทำขนมปัง เป็นต้น

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบกะหลายประการ เช่น

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

2. สามารถผลิตเซลล์ได้ที่ความเข้มข้นสูง (High-Cell Concentration) เช่นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงแบบกะโดยทั่วไปนั้น จะได้ปริมาณเซลล์ต่ำไม่เกิน 20 กรัมต่อลิตร

3. ช่วยลดผลจากกลูโคส (Glucose Effect) คือ การที่เมื่อมีกลูโคสในระบบการเพาะเลี้ยงมากเกินไป ส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสร้างเป็นสารอย่างอื่นขึ้นมาแทนการสร้างเซลล์ ซึ่งสารที่สร้างขึ้นมานั้นอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตเองได้ เช่น ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการสร้างอะซิเตท (Acetate) ปริมาณมากจนเป็นพิษต่อการเจริญของเซลล์ และในการผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปังจากน้ำตาลมอลท์ หรือกากน้ำตาล พบว่ามีเอทานอลละลายปะปนอยู่กับยีสต์ในถังหมักเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่เพาะเลี้ยงสูง แม้จะมีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอก็ตาม ซึ่งเอทานอลที่เกิดขึ้นมานั้นจะทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง การสร้างเอทานอลแบบนี้เกิดจากอิทธิพลของกลูโคส (Glucose Effect) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดอิทธิพลของกลูโคสจึงมีการประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะขึ้นมา เพื่อให้เกิดการเติมกลูโคสทีละน้อยจนครบตามความเข้มข้นที่ต้องการ

4. ช่วยลดความหนืดของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์แทรน (Dextran) พูลลูแลน (Pullulan) และ แซนแทนกัม (Xanthan gum) การค่อย ๆ เติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องนั้นสามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักได้ เนื่องจากสารอาหารที่ค่อย ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เติมลงไปในระบบการเพาะเลี้ยง จะเข้าไปช่วยเจือจางน้ำหมักที่มีความหนืดมากได้ ซึ่งหากความหนืดในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดกวนจะต้องใช้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้น เกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

5. สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากเป็นระบบที่มีเพียงการเติมสารอาหารเท่านั้น ทำให้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงนั้นไม่ถูกเจือจาง จึงทำให้ได้เปรียบมากกว่าเชื้อชนิดอื่น

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาระดับสมดุลโดยการดึงน้ำหมักออกบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลที่เท่ากันระหว่างน้ำหมักที่ออกและอาหารใหม่ที่เติมเข้า ทำให้ปริมาตรภายใน อยู่ในสภาวะคงที่หรือสภาวะสมดุล (Steady State)

ระบบการหมักแบบต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ Chemostat และ Turbidostat โดย Chemostat เป็นการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติมสารอาหารถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ปรับตามอัตราการไหล ส่วน Turbidostat เป็นวิธีการที่ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกตั้งไว้ในระดับที่คงที่โดยการปรับอัตราการไหล ในทางปฏิบัติ ระบบการหมักแบบ Chemostat ง่ายกว่า Turbidostat เพราะว่าสามารถทำได้โดยการปั๊มที่อัตราไหลคงที่ ส่วน Turbidostat ต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดความขุ่น (Optical Sensing) และเครื่องควบคุมอื่น ๆ ซึ่งมีความยุ่งยากมากกว่า

ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

1. สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ให้คงที่ได้ เนื่องจากมีการเติมสารอาหารใหม่ตลอดเวลา ควบคู่กับการที่มีการดึงสารอาหารเก่าออกพร้อมกับเซลล์บางส่วน ทำให้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในปริมาณที่คงที่ และมีสารอาหารใหม่เข้าไปให้ใช้คงที่เท่ากัน

2. สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและทางกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่

3. สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่ได้โดยการปรับค่าอัตราการเจือจาง (Dilution Rate) ให้คงที่

ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

1. ไม่เหมาะกับการผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเซลล์จะถูกดึงออกจากระบบการหมักในขณะที่เซลล์ยังอยู่ในขั้นของการเจริญเติบโต (Growth Phase) อาจยังไม่เข้าขั้นที่เซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จะทำให้การเจริญของเซลล์เป็นแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานาน ซึ่งอาจเป็นผลให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่น ที่ปนเปื้อนเข้ามาและเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

3. การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้

การพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง

วิธีการเพาะเลี้ยงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากในการที่จะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง และมีการผลิตรีคอมบิแนนซ์โปรตีนในปริมาณสูง เพราะผลกระทบของสิ่งแวดล้อมและสภาวะสารอาหารล้วนแล้วแต่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างผลิตภัณฑ์ ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้การวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการพัฒนาไปในส่วนของกลยุทธ์การเติมสารอาหาร โดยปัจจัยสำคัญในการพัฒนากลยุทธ์นี้คือการทำให้การเติมสารอาหารนั้นไม่มากเกินไปจนทำให้เกิดการสะสมในถังหมักเกินปริมาณที่เซลล์จำเป็นต้องใช้ หรือไม่ให้น้อยเกินไปจนเซลล์เกิดการขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งการเลือกใช้และการพัฒนาแต่ละกลยุทธ์นั้นต้องมีการพิจารณาจากปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่ การเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ศักยภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ของสารตั้งต้นโดยที่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ สภาวะในการเหนี่ยวนำการสร้างผลิตภัณฑ์ และความสามารถในการวัดค่าตัวแปรต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีทั้งการใช้การเพาะเลี้ยงแบบกะ แบบต่อเนื่อง แบบเติมกะ และอื่น ๆ แต่การเพาะเลี้ยงที่นิยมมากที่สุดคือ เติมกะ

1. กลวิธีการเติมสารอาหารในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะเป็นกลวิธีที่เหมาะสมมากที่สุดในสำหรับการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงเนื่องจาก

1. สามารถขยายเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ (ซึ่งจะสำคัญมากกับการผลิตที่ปริมาณผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของเซลล์)

2. สามารถควบคุมสภาวะสำหรับกำหนดปริมาณของสารตั้งต้นและอัตราการใช้สารตั้งต้นในระหว่างการหมักได้ และ

3. สามารถควบคุมการสร้างผลพลอยได้ได้ เนื่องจากมีการควบคุมปริมาณของสารตั้งต้นให้เพียงพอกับความต้องการใช้ของจุลินทรีย์เท่านั้น

ในการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะนั้น กลวิธีในการเติมสารอาหารถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดในการทำให้การเพาะเลี้ยงประสบความสำเร็จ ซึ่งมีหลากหลายกลวิธีในการเติมสารอาหารที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ การใช้อัตราการเติมสารอาหารที่คงที่(Constant Rate Feeding) การเติมสารอาหารแบบ Stepwise Feeding และการเติมแบบ Exponential Feeding เป็นต้น ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เพื่อให้การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะประสบความสำเร็จ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

- การเติมสารอาการแบบคงที่ ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไปในถังหมัก จะเป็นไปตามอัตราที่กำหนดไว้ คือมีอัตราการเติมที่คงที่ตลอด และเมื่อเวลาผ่านไป ความเข้มข้นของเซลล์และปริมาตรในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่อง และความเข้มข้นของเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ

- Stepwise Feeding เป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ โดยการเติมสารอาหารลงไปมากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

- Exponential Feeding เป็นกลวิธีที่มีการเติมสารอาหารที่พัฒนาขึ้นมาจากความคิดที่ว่าเซลล์สามารถมีการเจริญโตแบบทวีคูณ (Exponential) ได้ถ้าอัตราการเติมสารอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ซึ่งกลวิธีการเติมสารอาหารแบบนี้มีข้อดีคือช่วยลดการสร้างอะซิเตรตในกระบวนการได้ โดยการควบคุมอัตราการเจริญเติบจำเพาะให้ต่ำกว่าค่าวิกฤติในการสร้างอะซิเตรต

2. Two Stage Cyclic Fed-Batch Process

เป็นการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะโดยการส่งถ่ายน้ำหมักในระยะที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโต (Growth Stage) ไปยังระยะที่เป็นการผลิต (Production Stage) แล้วเก็บไว้เพียงบางส่วนให้ยังคงอยู่ในระยะของการเจริญเติบโตต่อไปจากนั้นจึงเติมอาหารที่เตรียมไว้ก่อนหน้าจนเต็มปริมาตรที่ต้องการใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการเติมที่เหมาะสม ในขณะที่ส่วนที่ย้ายออกไปเพื่อให้เข้าขั้นของการผลิตผลิตภัณฑ์ คือเหนี่ยวนำให้ยีนเกิดการแสดงออกและสร้างผลผลิตนั้นต้องมีการปรับสภาวะ ทั้งในเรื่องของ pH อุณหภูมิ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรือสูตรอาหาร ซึ่งสามารถจะควบคุมให้เหมือนหรือแตกต่างจากในขั้นของการเจริญเติบโตอย่างไรก็ได้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด

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

เป็นเทคนิคที่ควบคุมอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ด้วย Temperature Profile ที่ค่อย ๆ ลดลงที่ละน้อย มากกว่าที่จะควบคุมด้วย Feeding Profile ซึ่งมีสองกลไกที่ช่วยให้เทคนิคนี้สามารถมีการสะสมผลผลิตได้มากกว่า เนื่องจากเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis) น้อยลง เนื่องจาก

1. การใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่ำ
2. เซลล์มีการตายน้อยและปล่อยเอนไซม์โปรติเอส (Protease) สู่อาหารเพาะเลี้ยงลดน้อยลง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. A-Stat

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

5. Dialysis Fermentation

การหมักแบบ Dialysis เป็นเทคนิคที่สามารถแก้ปัญหาในเรื่องการถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยอะซิเตรตและสารอาหารอื่น ๆ เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงได้ ซึ่ง Dialysis หมายถึงการแยกของโมเลกุลละลายน้ำต่าง ๆ โดยอาศัยการแพร่ที่ไม่เท่ากันของแต่ละโมเลกุลผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Semi-Permiable Membrane) ที่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความเข้มข้นของแต่ละโมเลกุล รูปร่างของถังที่มีเป้าหมายในการเป็น Dialysis Reactor ที่อ้างอิงตามแนวคิดของ Shiloach and Fass (2005) จะมีอยู่ 2 รูปร่าง คือ

1. มีถังหมัก 2 ถัง ที่ประกอบด้วยถังสำหรับเพาะเลี้ยงที่มีช่องเติมอาหารเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ Dialysis

2. เป็นถังหมักแบบ Dialysis ที่ประกอบด้วยสองช่อง (Chamber) ที่แยกออกจากกันโดยใช้ Dialysis Membrane เป็นแผ่นกั้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว Dialysis Reaction แบบถังเดียวนั้นไม่ค่อยเป็นที่นิยมในการนำมาใช้มากเท่าไหร่ เนื่องจากยากต่อการฆ่าเชื้อและไวต่อกลไกความเครียดและการจำกัดปริมาณออกซิเจนในการเพาะเลี้ยง

6. Pressurized Cultivation

เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่มีการนำการเติมอากาศรวมกับการเพิ่มความดันภายในถังมาใช้ร่วมกัน เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ของเซลล์ แต่การเพิ่มความดันโดยให้อัตราการเติมอากาศคงที่ในการเพาะเลี้ยงนั้นทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้น เป็นผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่หากมีการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศตลอดระยะเวลาที่มีการเพิ่มความดันนั้น จะสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ซึ่งเทคนิค

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนการใช้การเติมแก๊สออกซิเจนบริสุทธิ์ได้ ซึ่งมีราคาแพง ไม่เหมาะกับการนำมาใช้งานจริง

7. Perfusion Techniques

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

แหล่งคาร์บอน

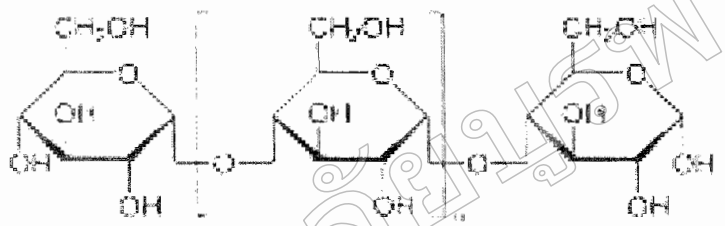
แหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในการสร้างพลังงาน และนำไปสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biosynthesis) เพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ และการบำรุงเซลล์ ในอาหารสำหรับการหมัก การเพาะเลี้ยงใส่แหล่งคาร์บอนลงไปเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีขายในทางการค้าและสามารถนำมาใช้ในการเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในการหมักได้เป็นอย่างดี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

โดยทั่วแล้วโพลิแซคคาไรด์จะไม่สามารถถูกนำมาใช้งานได้ทันที หรือนำไปใช้ได้ยากไม่เหมือนกับโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ แต่ก็ยังสามารถที่จะถูกนำไปใช้ได้โดยตรงในจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ซึ่งส่วนมากเป็นจุลินทรีย์จำพวกเชื้อรา โดยจะปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์และย่อยให้กลายเป็นมอลโทส และกลูโคส ก่อนลำเลียงเข้าเซลล์

เดกซ์ทริน (Dextrin) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) ถูกจัดเป็นแป้งดัดแปลง (Modified Starch) ชนิดหนึ่ง มีสูตรโมเลกุล คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อผ่านการทำให้แห้งจะมีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีเหลือง เดกซ์ทรินได้จากการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งด้วยกรด หรือเอนไซม์ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ ซึ่งก็ได้แก่เอนไซม์ในกลุ่มของอะไมเลส คือ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีความสามารถในการย่อยโมเลกุลของแป้งที่มีกิ่งข้างให้กลายเป็นกลูโคส (Glucose) ได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่มีความสามารถที่จะย่อย พันธะ 1, 6 ที่เป็นจุดเชื่อม จึงต้องมีการใช้เอนไซม์อีกตัวหนึ่ง คือ 1, 6 กลูโคซิเดส มาทำการย่อยต่อจึงจะได้เป็นกลูโคส หรือมอลโทส (Moltose)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเดกซ์ทริน เป็นสารผสมระหว่างโพลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก 1, 4 หรือ 1, 6 ในจำนวนที่ไม่แน่นอน เดกซ์ทรินเป็นสารที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการการย่อยสลายแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ คือระหว่างขั้นตอนแรก โดยการใช้เอนไซม์แอลฟา อะไมเลสเข้าไปใช้ในการย่อยแป้ง จะได้เป็นเดกซ์ทรินที่มีขนาดโมเลกุลไม่แน่นอน ซึ่งส่วนมากเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ามอลโตส แต่เล็กกว่าโพลิแซคคาไรด์



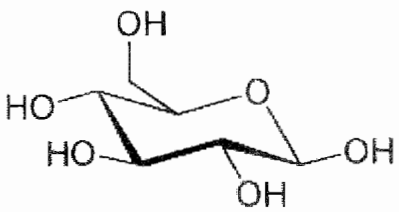
ภาพที่ 2-1 โครงสร้างโมเลกุล ของ เดกซ์ทริน (http://en.wikipedia.org/wiki/Dextrin)

จุลินทรีย์ส่วนมากจะไม่สามารถย่อยสลาย หรือนำเดกซ์ทรินไปใช้ในกระบวนการเมตาโบไลท์ (Metabolites) ต่าง ๆ ได้ ยกเว้นบางชนิดที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์จำพวกกลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถปล่อยเอนไซม์ดังกล่าวออกมาย่อยให้ได้เป็นกลูโคสแล้วจึงนำเข้าไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ได้

กลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซคคาไรด์ (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

การผลิตกลูโคสนั้นเป็นกระบวนการที่ทำต่อจากการผลิตเดกซ์ทริน คือนำเดกซ์ทรินมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งสามารถตัดปลายกลูโคสจากสายเดกซ์ทรินทีละโมเลกุล จนเหลือเฉพาะโมเลกุลของกลูโคส ที่สามารถนำมาใช้งานได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



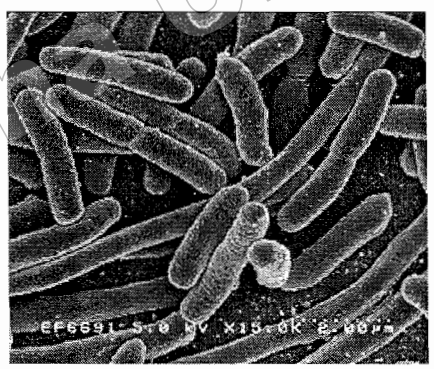
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคส (http://th.wikipedia.org/wiki/กลูโคส)

จุลินทรีย์ต้นแบบ

จุลินทรีย์ต้นแบบที่พบว่ามีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่

1. ***E. coli***

โดเมน	: Bacteria	ไฟลัม	: Proteobacteria
ชั้น	: Gammaproteobacteria	ลำดับ	: Enterobacteriales
แฟมมิลี่	: Enterobacteriaceae	จีนัส	: *Escherichia*
สปีชีร์	: *E. coli*		



ภาพที่ 2-3 ลักษณะเซลล์ *E. coli* (Matthew, 2012)

E. coli ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1885 โดยนักแบคทีเรียวิทยา (Bacteriologist) ชาวเยอรมัน ที่ชื่อว่า Theodor Escherich โดยเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่หลัก ๆ ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์และลำไส้ส่วนล่างของสัตว์เลือดอุ่น บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษ จากน้ำ หรือจากอาหารได้ โรคท้องร่วง และยังเป็นปัญหาอย่างมากโดยเฉพาะในทารกและสัตว์แรกเกิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีความสามารถในการอยู่ได้ทั้งแบบที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative Anaerobe) จัดอยู่ในกลุ่มครอบครัวของ Enterobacteriaceae หรือมักอ้างอิงให้เป็น Enterobacteria หรือ Entericbacteria มีลักษณะเป็นท่อนสั้น มีความกว้างประมาณ 0.3-1 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 1.0-3 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา แบ่งตัวแบบ Binary Fission หลังจากการเกิดการอิลองเกชัน (Elongation) จนมีความยาวเป็นสองเท่าของความยาวปกติ โดยทั่วไปแบคทีเรียชนิดนี้จะมีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ในการหมัก เช่น กรดแลคติก (Lactic Acid) กรดอะซิติก (Acetic Acid) และกรดฟอร์มิก (Formic Acid) เป็นต้น

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

2. *S. cerevisiae*

อาณาจักร: Fungi	ไฟลัม : Ascomycota
ซับไฟลัม: Saccharomycotina	ชั้น : Saccharomycetes
ลำดับ: Saccharomycetales	แฟมิลี่ : Saccharomycetaceae
จีนัส : *Saccharomyces*	สปีชีร์ : ***S. cerevisiae***

S. cerevisiae เป็นสายพันธุ์ที่มีบทบาทในวิวัฒนาการของจุลชีววิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์มาก โดยในระยะเวลา 25 ปีที่ผ่านมากลายเป็นแบบจำลองเซลล์ยูคาริโอตสำหรับการศึกษาหลายด้าน ได้แก่ ชีวเคมี ชีววิทยาของเซลล์ พันธุศาสตร์ และชีววิทยาระดับโมเลกุล *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีการใช้ประโยชน์มากที่สุด ตั้งแต่สมัยโบราณในการทำขนมปังและเบียร์ เป็นที่เชื่อกันว่ายีสต์ชนิดนี้พบครั้งแรกที่ผิวขององุ่น หรือผลไม้ตระกูลลูกพรัม เป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในกระบวนการหมัก *Saccharomyces* มาจากคำว่า Latinized ในภาษกรีก ที่แปลว่า วิธีการปั้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

น้ำตาล หรือเชื้อราน้ำตาล โดยที่ คำว่า *saccharo* แปลว่า น้ำตาล และ *myces* แปลว่า เชื้อรา ส่วนคำว่า *cerevisiae*. มาจากภาษาลาตินและหมายถึงเบียร์ เซลล์ของ *S. cerevisiae* เป็นรูปทรงรีคล้ายไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ เจริญแบบอาศัยออกซิเจนและไม่อาศัยออกซิเจน (Facultative Anaerobic) โดยทั่วไปจำเป็นต้องใช้สารอาหารได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ทั้งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจน รวมไปถึงต้องมี แหล่งวิตามิน เช่น ไบโอติน เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยง (Mimage, 2006)

ภาพที่ 2-4 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* (Life science foundation, 2012)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อดีของยีสต์ที่ได้รับการยกย่องให้เป็นต้นแบบของยูคาริโอต

S. cerevisiae นับเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับให้เป็นต้นแบบสำหรับ ยูคาริโอต ด้วยหลายเหตุผล ดังที่ สาวิตรี ลิ่มทอง (2549) ได้กล่าวไว้ ดังนี้

เหตุผลทางด้านประวัติศาสตร์

1. เซลล์และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเซลล์นั้นเป็นที่ยอมรับในสาธารณะ
2. เป็นยีสต์อุตสาหกรรมที่ไม่เป็นเชื้อโรค
3. เป็นยูคาริโอตที่ไม่ซับซ้อน และมีการศึกษามากที่สุดทางด้านชีวเคมีและพันธุศาสตร์

เหตุผลทางด้านเทคโนโลยี

1. การเจริญของยีสต์ในปริมาณมาก ๆ ทำได้ง่ายและปลอดภัย

2. เทคโนโลยีการหมักและการแยกผลิตภัณฑ์ของยีสต์สามารถเข้าใจและพัฒนาได้ง่าย

3. เทคโนโลยีการขยายขนาดจากระดับงานวิจัยจึงถึงการผลิตค่อนข้างตรงไปตรงมา

4. แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ทันทีมีราคาไม่แพง และมีหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการเจริญของเซลล์และในการหมักได้

5. ผลิตยีนจากแหล่งอื่น ๆ ได้ในระดับสูง ทั้งที่สะสมไว้ภายในเซลล์และหลั่งออกสู่นอกเซลล์

เหตุผลทางพันธุศาสตร์

1. เป็นยูคาริโอต และมีความสามารถในการแสดงออกของยีนจากยูคาริโอตชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. มีความสามารถในการปรับตัวได้อย่างดี เพื่อให้ผลผลิตจากผลิตภัณฑ์เมแทบอลิซึมสูง นอกจากนั้นยังทนทานดีในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และมีความกดดันสูง

3. จีโนมค่อนข้างเล็ก และสามารถดัดแปลงโดยการนำผสมพันธุ์แบบดั้งเดิมและการใช้เทคนิคสมัยใหม่ คือรีคอมบิแนนซ์ ดีเอ็นเอ

4. สามารถสร้างสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตสูง

5. รู้ว่าโคดอนที่เลือกใช้คืออะไร

6. มีเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกสำหรับสายพันธุ์ที่มีโครโมโซมหลายชุด

7. มีพลาสมิด เช่น 2 ไมโครเมตร ดีเอ็นเอ แต่ไม่มีไวรัสสำหรับฆ่าเซลล์

เหตุผลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

1. การทรานสฟอร์มเมชันเป็นไปได้ทั้งโดยใช้พาหนะชนิดถ่ายแบบด้วยตัวเองและพาหะชนิดรวมตัว

2. มีกลไกการดัดแปลงหลังการถ่ายแบบ ซึ่งหมายถึงการไกลโคซิเลชันเกิดร่วมกับ Proteolytic Maturation Particle Assembly

3. การหลั่งโปรตีนค่อนข้างมีประสิทธิภาพและควบคุมได้โดยลำดับสัญญาณภายใน

4. สามารถตัดแยกอินทรอนออกจากยีนสัตว์ได้

5. อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสของยีสต์จดจำโพรโมเตอร์ของยีนจากสัตว์หลายชนิด ดังนั้นรีคอมบิแนนซ์ ดีเอ็นเอเทคโนโลยี จึงเรียกว่าเป็น Idal Host

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประโยชน์จากยีสต์

1. มีศักยภาพใช้เป็นแหล่งของโปรตีนเนื่องจากมีโปรตีนเฉลี่ย 46.4-58.3 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงมีกรดอะมิโนจำเป็นครบอีกด้วย ยิ่งกว่านั้นยังประกอบด้วยธาตุหลายชนิดที่คนและสัตว์ต้องการปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิด โดยเฉพาะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบีรวม และยังมีวิตามินดี และวิตามินอี และใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมหรือเพิ่มกลิ่นรสของอาหารคนและสัตว์มาเป็นเวลานาน

2. มีความสามารถในการนำมาใช้ผลิต รีคอมบิแนนซ์โปรตีน ซึ่งได้รับการยอมรับให้เป็นต้นแบบของยูคาริโอติก เซลล์ สามารถที่จะผลิตโปรตีนสัตว์ รวมถึงโปรตีนมนุษย์ได้หลายชนิด เช่น อินเตอฟีรอน ซีรัมอัลบูมิน วัคซีน และอื่น ๆ มากมาย เนื่องจากมีความเป็นยูคาริโอตเช่นเดียวกัน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

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

3.1 การผลิตไวน์ พบว่าไวน์ยีสต์เกือบทั้งหมด เป็น *S. cerevisiae* เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่เจริญและหมักได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดค่อนข้างสูง เนื่องจาก พีเอชของน้ำองุ่นอยู่ในช่วง 3-3.9 และมีความทนต่อเอทานอลที่พอจะทำให้ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และยังสามารถปรับตัวให้เจริญและหมักต่อได้ปกติ เมื่อมีซัลเฟอไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำ

3.2 การผลิตเบียร์ เนื่องจากมีเอนไซม์ 2 ชนิดมอลเทส (Maltase) และ มอลโทสเพอมิเอส (Maltose Permease) จึงทำให้มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลมอลโทสที่มีอยู่ในมอลท์ ได้ดี เป็นที่นิยมในการนำมาผลิตเป็น ทอปเฟอร์เมนต์เบียร์ (Top-Fermented Beer) และเอลเบียร์ (Ale Beer)

3.3 การผลิตไซเดอร์

3.4 การผลิตสุรากลั่น ต่าง ๆ เช่น บรั่นดี เป็นต้น

4. การผลิตยีสต์ขนมปัง

5. การผลิตเอนไซม์ ใช้ในการผลิตเอนไซม์อินเวอเทส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง *E. coli*

Matsui et al. (1989) เพาะเลี้ยง *E. coli* K12 โดยใช้สารอาหารสังเคราะห์ที่มีเกลือแร่สูง ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ที่ไม่มีการเติมสารอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์ แต่ใช้การเติมกลูโคสผงแทน และมีการใช้เทคนิคการเพิ่มความดันในถังหมักร่วมกับการใช้แก๊สออกซิเจน เพื่อทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำภายในถังหมักมีเพิ่มมากขึ้น เซลล์จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยสามารถเจริญเติบโตได้มากถึง 134 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร ซึ่งมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ดังนี้คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ความเร็วในการกวนผสมที่ 1,000 รอบต่อนาที กำหนดให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำอยู่ที่ 6.5 ส่วนต่อล้านส่วน (ppm) และเมื่อมีการนำมาประยุกต์ใช้กับ *E. coli* ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามีการเจริญเติบโตเท่ากับ 102 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

Korz et al. (1995) ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* TG1 ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยใช้เทคนิคการเติมแหล่งคาร์บอนปริมาณที่จำกัดในอาหาร Define Medium ซึ่งสามารถลดปัญหาการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่มีสาเหตุจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป (Substrate Inhibition) ได้ จึงไม่ก่อให้เกิดการสร้างกรดอะซิติกซึ่งเป็นผลพลอยได้ ที่ไม่ต้องการขึ้นมา และเป็นผลให้มีการสะสมเซลล์ความเข้มข้นสูงมากถึง 128 และ 148 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรจากการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ กลูโคสและ กลีเซอรอล ตามลำดับ สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 6.7 อัตราการเติมอากาศ 2.5 ลิตรต่อนาที อัตราการเติมออกซิเจน 0.1 ลิตรต่อนาที ความเร็วในการกวนผสม 500 รอบต่อนาที และปริมาตรการเพาะเลี้ยงคือ 2.5 ลิตรในถังหมักขนาด 5 ลิตร

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

Fuchs et al. (2002) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่ผ่านกระบวนการรีคอมบิแนนซ์ด้วย Dialysis Fermenter ทั้งระดับห้องปฏิบัติการ (2 ลิตร) และระดับโรงงานต้นแบบ (300 ลิตร) โดยมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุนใบพัด 200-750 รอบต่อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นาที ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นมากถึง 190 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

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

Matsui et al. (2006) ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง แบบเติมกะที่มีการเพิ่มความดันในถังหมัก ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าเดิม โดยมีการเพิ่มความดันในถังหมักควบคู่กับการควบคุมให้ระยะทางในการแทรกตัวของอากาศในของเหลวคงที่ โดยใช้อากาศธรรมดา แทนการใช้ออกซิเจนบริสุทธิ์ ซึ่งมีราคาแพง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 6-6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสผงเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งวิธีการนี้สามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นมากถึง 130 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และเมื่อลองใช้ในการเพาะเลี้ยงกับ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม ก็สามารถได้เซลล์ความเข้มข้นมากถึง 102 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคการเพิ่มความดัน โดยการควบคุมให้อัตราการเติมอากาศคงที่นั้นไม่สามารถช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตแบบเซลล์ความเข้มข้นสูงได้

Faulkner et al. (2006) ได้มีการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงของ *E. coli* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยพัฒนา Feeding Profile ให้รักษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่สามารถจำกัดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ คือให้มีอัตราการเจริญ (Growth Rate) ต่ำกว่าอัตราการเจริญวิกฤติ (Critical Growth Rate) เพื่อให้เซลล์เกิดการสร้างอะซิเตรตขึ้นมา จากนั้นทำให้อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารอีกครั้งเพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการดูดซับอะซิเตรต ที่สร้างขึ้นมาเองในช่วงแรก ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคนี้มีค่าเป็น 53 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 อัตราการกวนอยู่ในช่วงระหว่าง 236 ถึง 1000 รอบต่อนาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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

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 และการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้จะทำการปรับอัตราการเติมสารอาหารโดยการติดตั้งตัวควบคุม เพื่อควบคุมให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ในระดับที่ตั้งไว้ ซึ่งพบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้มากสุดถึง 120 กรัมต่อลิตร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae*

Raj et al. (2002) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* แบบเติมกะที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น โดยใช้กลวิธีในการเติมสารอาหารคือ การวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของ ค่าพีเอชแบบ On Line หากค่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากค่าที่กำหนดไว้ คือ 5.0 ± 0.1 ระบบก็จะทำการเติมกลูโคสและแอมโมเนียม ฟอสเฟตลงไป โดยอัตโนมัติ ซึ่งการที่ค่าพีเอชมีค่าสูงนั้นเกิดจากการที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการปล่อยโปรตรอนลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้พีเอชมีค่าน้อยลงจากที่ตั้งไว้ ในการทดลองในครั้งนี้พบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้ความเข้มข้นมากถึง 140 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร ภายใต้การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 16 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 400-700 รอบต่อนาที ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในให้คงที่ที่ 75-90 เปอร์เซ็นต์ โดยในช่วงแรกมีการเติมอากาศโดยใช้อากาศที่ 0.1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และเปลี่ยนเป็นการเติมด้วยแก๊สออกซิเจนที่ 0.5 ปริมาตรออกซิเจนต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโต

Kim et al. (2007) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* เพื่อผลิตเบตา-กลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบมากในผนังเซลล์ของยีสต์ โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep Liquir) และเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบเติมกะ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบเติมกะ โดยใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น สามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุดมากถึง 95.7 กรัมต่อลิตร โดยใช้

323054

สารละลายกากน้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในถังหมักที่อัตราการเติม 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเซลล์ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมากถึง 2.4 เท่า

Wang et al. (2007) ได้ศึกษาการผลิตกลูตาไธโอน (Glutathione) จาก *S. cerevisiae* โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่ควบคุมการเติมสารอาหารแบบการควบคุมย้อนกลับ คือมีการควบคุมการเติมปริมาณกลูโคสตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการหายใจของเซลล์ โดยมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 180 รอบต่อนาที พีเอช 5.2 ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้มากถึง 140 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 52 ชั่วโมง แต่เมื่อทดลองเติมกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถให้ผลผลิต Glutathione เพิ่มมากขึ้น และช่วยทำให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นลง หรือเพียงแค่ 38 ชั่วโมงเท่านั้น เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงอื่นที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University