



การผลิตมวลเซลล์ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ
THE PRODUCTION OF *Bacillus* sp. CELL BIOMASS AT HIGH CONCENTRATION BY
BATCH CULTIVATION

จตุพร สุขหนา

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

1349875838

BUD IThesis 59910006 Thesis / recv: 29092563 15:46:08 / seq: 36

59910006_1349875838

การผลิตมวลเซลล์ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ

จตุพร สุขหนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

THE PRODUCTION OF *Bacillus* sp. CELL BIOMASS AT HIGH CONCENTRATION BY
BATCH CULTIVATION

JATUPORN SUKNA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGICAL SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2020


COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

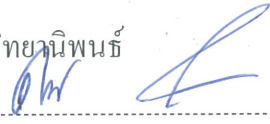





2820514691

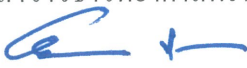
BUU_Thesis_59910006_thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ จตุพร สุขหนา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร นำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชงใจ โอชัยกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร นำศาสตร์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พ็ชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวิฐ ศรีสุข)

วันที่ 14 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2563



2820514691

59910006: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: เซลล์ความเข้มข้นสูง, การเพาะเลี้ยงแบบกะ, เดกซ์ตริน, บาซิลลัส

จดุพร สุขหนา : การผลิตมวลเซลล์ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ. (THE PRODUCTION OF *Bacillus* sp. CELL BIOMASS AT HIGH CONCENTRATION BY BATCH CULTIVATION) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ปี พ.ศ. 2563.

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการผลิตมวลเซลล์ของ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูง ด้วยอาหารประเภทสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบ (defined medium) โดยใช้โกลิโกเมอร์ของกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ตริน) ที่ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ แบบให้อากาศ (aerobic batch) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงอย่างง่ายและราคาถูก การศึกษาในระดับฟลask พบว่า อาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) มีประสิทธิภาพเหมาะสมกว่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ โดยให้มวลเซลล์ 6.77 กรัมต่อลิตร และ เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น การใช้เดกซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพเหมาะสม โดยสามารถผลิตมวลเซลล์ได้ถึง 12.93 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่าการการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระดับถังหมัก 5 ลิตร สามารถใช้เดกซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงได้ถึง 100 กรัมต่อลิตรโดยไม่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และพบว่าเพิ่มผลผลิตมวลเซลล์ได้สูงถึง 31.98 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ระดับถังหมัก 30 และ 300 ลิตร เพื่อศึกษาสภาพของการขยายขนาดการผลิตที่ระดับโรงงานต้นแบบ ผลปรากฏชัดว่าได้ผลดีโดยให้ความเข้มข้นของมวลเซลล์ 43.49 และ 47.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ด้วยอัตราการผลิต (productivities) 2.94 และ 3.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นชัดเจนถึงประสิทธิภาพการผลิตที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับผลงานวิจัยของผู้อื่น



59910006: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: HIGH-CELL-DENSITY, BATCH CULTIVATION, DEXTRIN, *Bacillus* sp.

JATUPORN SUKNA : THE PRODUCTION OF *BACILLUS* SP. CELL BIOMASS AT HIGH CONCENTRATION BY BATCH CULTIVATION. ADVISORY COMMITTEE: SAETHAWAT CHAMSART, 2020.

This research was to study the production of *Bacillus* sp. cell biomass at high concentrations with a defined medium using glucose oligomer (dextrin) from cassava starch liquefaction as the carbon source at high concentrations with the aerobic batch cultivation technique, which is simple and inexpensive. This study in shake flask culture found that the Batch Production Medium (BPM) provided an optimal result with a cell concentration of 6.77 g/l. When compared to other culture media, using dextrin as the carbon source at a high concentration showed an optimal cell concentration of 12.93 g/l. In addition, cell cultivation in a 5-liter, the concentration of carbon source dextrin was able to increase up to 100 g/l without growth inhibition, and enhancement of a cell concentration to 31.98 g/l. Further, the scaled-up studies of cell cultivation in 30 and 300-liter fermenters were carried out in order to study the production potential at pilot scales. They clearly showed very good results of cell concentrations of 43.49 and 47.03 g/l with the productivities of 3.11 and 3.92 g/l/h, respectively. The results of these studies essentially demonstrated higher efficient productions when compared to those of other research works.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร น้า ศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง เป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และ อาจารย์ ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์ ประธานและคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง เหมาะสมและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อทรงพล สุขหนา คุณแม่ปราณี สุขหนา คุณยายเรียง บุญกอง และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนทั้งด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณขวัญฤทัย มาลัยเรือง ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ช่วยแนะนำการวิจัย ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา เพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจในระหว่างทำวิจัย

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแต่ บุพการี บวรอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและ ประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

จตุพร สุขหนา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.6 สถานที่ดำเนินการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ความหมายและความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง.....	5
2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง.....	7
2.3 ปัญหาและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง.....	7
2.4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง.....	7
2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ.....	8
2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ.....	9
2.4.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง.....	11
2.5 การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง	13
2.6 ปัจจัยที่ใช้ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง.....	16
2.6.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง.....	16



2920514991

BUU_Thesis_59910006_Thesis / recv: 01082563_15:02:13 / seq: 35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.1 สภาวะทางกายภาพ.....	20
2.7 จุลินทรีย์ <i>Bacillus</i> sp.	22
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย.....	28
1. วัสดุ อุปกรณ์.....	28
2. สารเคมี.....	29
3. สูตรอาหาร.....	30
4. เชื้อจุลินทรีย์.....	30
5. วิธีการวิจัย.....	30
6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	38
7. การคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์.....	39
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	41
4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) ต่อการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ในระดับพลาสติก.....	41
4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็น แหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ในระดับพลาสติก.....	47
4.3 ผลการศึกษาการใช้เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	54
4.4 ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. แบบกะที่ระดับถังหมัก ขนาด 30 ลิตร.....	61
4.5 ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. แบบกะที่ระดับถังหมัก ขนาด 300 ลิตร.....	62
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	65
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	65



2820514681

BUU_Thesis_59910006_Thesis / recv: 01082563_15: 02: 13 / seq: 35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2 สรุปผลการทดลอง.....	75
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	76
บรรณานุกรม.....	77
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก.....	85
ภาคผนวก ข.....	89
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	92



2820514691

BUU ThesIs 59910006 thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. จากการเพาะเลี้ยงด้วย สูตรอาหารที่แตกต่างกัน ในระดับพลาสติก.....	44
2 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. จากการเพาะเลี้ยงด้วย แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในระดับพลาสติก.....	51
3 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. จากการเพาะเลี้ยงแบบ กะโดยใช้เดกซ์ตรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ในถังหมัก 5 ลิตร.....	58
4 ตารางเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ.....	72



2920514091

BUU 1Thesis 59910006 Thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ชนิดของเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ.....	13
2 โครงสร้างโมเลกุลของเดกซ์ตริน.....	18
3 โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคส.....	19
4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ <i>Bacillus</i> sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	23
5 การจัดเตรียมถังหมักขนาด 5 ลิตร สำหรับเพาะเลี้ยงแบบกะ.....	33
6 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 30 ลิตร.....	35
7 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร.....	36
8 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร BPM.....	42
9 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร NB.....	42
10 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร Schaeffer's.....	43
11 ผลการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ สูตร BPM, NB และ Schaeffer's.....	46
12 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีเดกซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอน...	48
13 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีกลูโคสทางการค้าเป็นแหล่ง คาร์บอน.....	48
14 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำ- ปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	49
15 ผลการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีแหล่งคาร์- บอนแตกต่างกัน 3 แหล่ง ได้แก่ กลูโคสทางการค้า กลูโคสจากการย่อยแป้งมัน สำปะหลัง และเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง.....	53
16 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร.....	55
17 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร.....	56



2820514681

BUU 1Thesis 59910006 Thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร.....	57
19 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร.....	60
20 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 30 ลิตร.....	62
21 การเพาะเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 300 ลิตร.....	64



2820514091

BUU Theses 59910006 thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีวภาพมีความก้าวหน้าอย่างมาก โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม การผลิตมวลเซลล์ให้ได้ปริมาณมาก ๆ เป็นวิธีการที่สำคัญและได้มีการพัฒนา มาโดยตลอดเพื่อตอบสนองการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพในปริมาณสูง “ การเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ ความเข้มข้นสูง หรือ High-Cell-Density Culture (HCDC) ” เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงมี วัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญและปริมาณมวลเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงของจุลินทรีย์ (Riesenberg & Guthke, 1999) การศึกษาการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงนี้ประสบความสำเร็จอย่างมากในด้านการแพทย์ เช่น การผลิตอินเตอร์เฟอรอน (Interferon) อินซูลิน (Insulin) แอนติบอดี (Antibody) และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของมนุษย์ (Growth factor) จาก รีคอมบิแนนท์ของจุลินทรีย์ ในด้านของการเกษตร เช่น การผลิตสารส่งเสริมและสารกระตุ้นการ เจริญเติบโตของพืช สารฆ่าแมลง รวมทั้งสารควบคุมทางชีวภาพ และในด้านอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ การผลิตเอทานอล การผลิตกรดอินทรีย์ พอลิเมอร์ชีวภาพ และการผลิต พลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) เป็นต้น ซึ่งปกติการผลิตเซลล์จากเทคนิคทั่วไปนั้นทำให้ได้มวล เซลล์น้อยทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่น้อยตาม ต้นทุนการผลิตแพง และเมื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการ เพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงจะทำให้ได้เซลล์มาก ผลิตภัณฑ์ที่ได้มากตามและต้นทุนถูกลง

ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างที่จะทำให้การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงประสบความสำเร็จ คือ สูตรอาหาร โดยสูตรอาหารที่ได้รับความนิยมใช้จะเป็นสูตรอาหารแบบ Synthetic หรือ Chemically defined media ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ทราบองค์ประกอบและปริมาณที่แน่นอน ภายในสูตรอาหารจะ ประกอบไปด้วยแหล่งของคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง แร่ธาตุ และ วิตามินต่าง ๆ แหล่งของคาร์บอนที่มาจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความ น่าสนใจนอกจากจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่หาง่ายและราคาถูกแล้วยังได้แร่ธาตุอื่น ๆ ที่มีผลต่อการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย นอกจากนี้สูตรอาหารแล้วการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ส่วนใหญ่นิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch cultivation) ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบเติม กะ (สุชาติ จันทร์ประทีป นภทร, 2559) นั้นเป็นเทคนิคที่มีข้อเสีย คือ เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง วัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการมีราคาแพงและมีกระบวนการควบคุมที่ยุ่งยาก รวมถึงเวลาที่ใช้ใน การผลิตนานเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch cultivation) เนื่องจากมีการควบคุมให้ระบบ

มีสถานะปลอดการปนเปื้อน การดำเนินการง่ายอุปกรณ์ที่ใช้ไม่ยุ่งยากและไม่มีค่าใช้จ่ายมาก รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงมีความแข็งแรง เกิดการผ่าเหล่าได้ยาก

Bacillus sp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมชีวภาพ เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น โปรติเอส โคคิเนส อะไมเลส ไลเปส ซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษฟอก อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษและการแพทย์ ซึ่ง *Bacillus* sp. เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก ที่สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและอุณหภูมิปกติ และมีการเพาะเลี้ยงที่ง่าย ระยะเวลาที่ใช้เจริญเติบโตไม่นาน (Rosovitz, Voskuil & Chambliss, 1998) สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนในสูตรอาหารได้หลากหลาย นอกจากนี้ยังมีการนำมาศึกษาความสามารถในด้านอื่น ๆ อีกด้วย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมีความสนใจจะใช้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. มาเป็นแบบจำลองเพื่อทำการศึกษาวิธีการผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะร่วมกับสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิต เป็นสูตรอาหารที่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน ไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพง และความเป็นไปได้ของการใช้แหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการผลิต รวมทั้งแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสูงได้โดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาการคั่งของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นผลทำให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย ตลอดจนการขยายขนาดการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบ เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงจากเชื้อ *Bacillus* sp. ผู้การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอาหารสูตร minimal defined medium ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้เศษคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง
4. เพื่อศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ในระดับโรงงานต้นแบบ



1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. อาหารสูตร Batch production medium (BPM) มีประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. เพื่อการผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง
2. เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่ความเข้มข้นสูง
3. เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่ความเข้มข้นสูง
4. สามารถขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. เพื่อการผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงในระดับโรงงานต้นแบบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบประสิทธิภาพและความเหมาะสมของอาหาร BPM ต่อการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. มาใช้ในการผลิตเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูง
2. สามารถนำเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่ความเข้มข้นสูง
3. สามารถนำเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นสูงมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ที่ความเข้มข้นสูง
4. สามารถใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงแบบกะทั้งในระดับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และระดับโรงงานต้นแบบ ของการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. มาประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงเพื่อเป็นต้นแบบการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพสูตรอาหาร BPM เทียบกับอาหารสูตร NB และ Schaeffer's medium ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง ด้วยการเพาะเลี้ยงในพลาสติก
2. ศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนจาก กลูโคสทางการค้า กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้ง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ด้วยการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติก
3. ศึกษาการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งซึ่งแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูง สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

4. ศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะสำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. มาใช้ในการผลิตเซลล์ลินทรีย์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูงในระดับโรงงานต้นแบบ โดยใช้ถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 300 ลิตร

1.6 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ BS6201, BS6202 และห้องปฏิบัติการ โรงงานต้นแบบวิศวกรรมชีวเคมี (BS6208) อคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



2820514691

BUU-IThesis 59910006 thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้รับความเข้มข้นสูง (High-Cell-Density Culture; HCDC) ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามลำดับดังนี้

- 2.1 ความหมายและความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง
- 2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง
- 2.3 ปัญหาและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง
- 2.4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง
- 2.5 การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้รับความเข้มข้นสูง
- 2.6 ปัจจัยที่ใช้ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้รับความเข้มข้นสูง
- 2.7 จุลินทรีย์ *Bacillus* sp.
- 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายและความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง (High-Cell-Density Cultivation; HCDC)

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตสารชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก นับตั้งแต่เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมีความเจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีการใช้เซลล์จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตสารชีวภาพซึ่งเดิมผลิตขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น สามารถลดต้นทุนการผลิตสารนั้น ๆ ลงได้อย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารชีวภาพที่ใช้ในการแพทย์เพื่อรักษาผู้ป่วย ตัวอย่างที่ประสบความสำเร็จ ในระดับอุตสาหกรรมและการค้า ได้แก่ การผลิต Interferon (IF) อินซูลิน และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของมนุษย์ ซึ่งกระบวนการการผลิต IF แต่เดิมนั้นจะมีความซับซ้อนอย่างมาก ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากการผลิตโดยการแยกเม็ดเลือดขาวของมนุษย์จากผู้บริจาคโลหิต แล้วนำไปใส่ไว้ในไข่ไก่ จากนั้นฉีดไวรัสที่ก่อโรคในมนุษย์เข้าไปในไข่ไก่ เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในไข่ไก่จะสร้าง IF ขึ้นด้านไวรัส แล้วจึงทำการแยกเอา IF ออกมา ซึ่งกระบวนการนี้ต้องใช้โลหิตที่ได้รับบริจาคเป็นจำนวนมากถึง 90,000 ยูนิต เพื่อผลิต IF ให้ได้ 1 กรัม ซึ่งจะมีราคาถึง 50 ล้านดอลลาร์ต่อสหรัฐอเมริกา เช่นเดียวกับกระบวนการผลิตอินซูลินและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของมนุษย์ที่แต่เดิม อินซูลินที่ได้มาจากสุกรมีขั้นตอนการผลิตค่อนข้างยุ่งยาก โดยจะทำ



2820514691

BUU-IThesis 59910006 thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

การแยกอินซูลินจากตับอ่อนของสุกรซึ่งต้องรอให้สุกรเจริญเติบโตถึงวัยที่พอเหมาะซึ่งต้องใช้เวลานาน ทำให้ได้อินซูลินมีราคาแพง และกระบวนการการผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของมนุษย์ที่ได้จากสมองของคนที่เสียชีวิตแล้วไม่นาน โดยต้องใช้สมองจากผู้เสียชีวิตจำนวนมากและได้สารในปริมาณที่น้อย ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้แก้ปัญหา โดยการนำ cDNA ที่แปลรหัสได้เป็นสารที่ต้องการ มาใส่เข้าไปในเซลล์ *E. coli* ทำให้ได้เป็นรีคอมบิแนนซ์โปรตีน (Recombinant Protein) และนำไปผลิตโดยวิธีการเพาะเลี้ยงทำให้ได้สารที่ต้องการ ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิต และราคาสารที่ต้องการนั้นถูกลงทำให้การรักษาผู้ป่วยมีประสิทธิวิธามากขึ้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ, 2547) เมื่อการผลิตรีคอมบิแนนซ์โปรตีนประสบความสำเร็จ ทำให้มีความต้องการรีคอมบิแนนซ์โปรตีนเพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้ตลาดซื้อขายรีคอมบิแนนซ์โปรตีนโดยมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 10 – 15 ต่อปี และยังมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต (Werner, 2004) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและพัฒนาขั้นตอนการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนซ์โปรตีน โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูง (High-Cell-Density Cultivation) ซึ่งเป็นเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศที่มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการเพาะเลี้ยงให้มีอัตราการเจริญและการสะสมของเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงได้มีการศึกษาครั้งแรกในปี 1987 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นมากเพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ (Suzuki, Yamane and Shimizu, 1987) นอกจากการผลิตรีคอมบิแนนซ์โปรตีนแล้ว การเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงยังถูกนำมาใช้ในการผลิต โปรตีนเซลล์เดี่ยว รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากเซลล์อีกด้วย และนอกจากการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงที่ใช้กับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปแล้ว ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น อาศัยอยู่ในอุณหภูมิที่สูง (Thermophiles) อาศัยอยู่ในที่ร้อนและมีความเป็นกรดสูง (Thermoacidophiles) และอาศัยอยู่ที่เค็มจัด (Halophiles) (Krahe, Antranikian and Märkl, 1996) นอกจากจะมีการศึกษาในแบคทีเรียแล้วยังมีการพัฒนาและศึกษาการผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงในกลุ่มของอาร์เคียและยีสต์ด้วย

การศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องหาจุลินทรีย์ใหม่ ๆ ที่มีศักยภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ รวมไปถึงการพัฒนาเพื่อรองรับความต้องการของอุตสาหกรรมที่มีการเติบโตขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Riesenberg and Guthke, 1999)

2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงนอกจากช่วยให้ได้ผลผลิตปริมาณมากแล้ว ยังมีข้อดีอื่น ๆ ได้แก่ ช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตขึ้น ช่วยลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากขึ้นช่วยลดปริมาณการเพาะเลี้ยงทำให้ไม่ต้องมีการใช้อุปกรณ์หรือพื้นที่มากในการเพาะเลี้ยง ช่วยทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ง่ายขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของผลผลิตสูงขึ้น ช่วยลดค่าใช้จ่ายในเรื่องของอุปกรณ์และเครื่องมือ รวมไปถึงช่วยลดปริมาณน้ำเสียจากกระบวนการผลิต เนื่องจากปริมาตรในการเพาะเลี้ยงลดน้อยลง น้ำเสียที่เหลือจากกระบวนการเก็บเกี่ยวจะน้อยลงตามไปด้วย ซึ่งยังส่งผลให้ความเป็นพิษหรือการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมลดน้อยลง ค่าใช้จ่ายในเรื่องของการบำบัดน้ำเสียก็ลดลงตาม นอกจากนี้ยังช่วยให้มีปริมาณของผลิตภัณฑ์บางตัวที่มีความต้องการใช้อย่างมาก เช่น ในการเป็นยารักษาโรคเพียงพอต่อการใช้ไม่เกิดการขาดแคลนและยังสามารถกระจายไปสู่ประชาชนได้ในทุกระดับเนื่องจากมีราคาที่ไม่สูงจนเกินไป (Lee, 1996)

2.3 ปัญหาและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบความเข้มข้นสูงมีข้อดีแล้ว ยังมีข้อเสียหลายประการด้วยเช่นกัน คือ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้อาจทำให้สารตั้งต้น (substrate) จำกัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เอง หากมีการเติมสารตั้งต้นในปริมาณที่มากเกินไป นอกจากนี้อาจก่อให้เกิดการจับจำกัดในเรื่องของการให้อากาศและการส่งถ่ายออกซิเจนภายในระบบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเซลล์มีความต้องการใช้ออกซิเจนมาก ทำให้เกิดเป็นสภาวะขาดแคลนออกซิเจนและอาจเข้าสู่สภาวะการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) ได้ บางครั้งเซลล์ที่ปริมาณมากเกินไปอาจเกิดการทำลายตัวเองด้วยกระบวนการเซลล์ไลซิส (cell lysis) และโปรตีโอไลติก (proteolysis) นอกจากนี้ความเข้มข้นของเซลล์ที่มากขึ้นจะทำให้อัตราเมตาบอลิซึมที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดความร้อนขึ้นภายในระบบ ส่งผลให้การส่งถ่ายความร้อนภายในถึงมีประสิทธิภาพลดลงรวมถึงมีการสร้างคาร์บอน ไดออกไซด์มากขึ้นด้วย ซึ่งสิ่งที่เกิดขึ้นเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์ หรือมีการเปลี่ยนรูปผลิตภัณฑ์ไป จากการเปลี่ยนวิธีการเมตาบอลิซึม เช่น มีการสร้างผลพลอยได้ (by-products) เป็นต้น (Riesenberg & Guthke, 1999)

2.4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีการหลัก ๆ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch) และการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous) ซึ่งแต่ละวิธีการมีลักษณะของการควบคุมที่แตกต่างกัน รวมถึงระยะเวลาที่ยังมีความ

แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับพิจารณาปัจจัยที่จำเป็นต้องใช้ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง รวมถึงปัจจัยด้านอื่น ๆ ซึ่งจะทำให้การผลิตสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Cultivation)

เป็นระบบเลี้ยงเชื้อแบบปิดมีการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และเชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาการหมัก ดังภาพที่ 1 (a) ซึ่งอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลง เมื่ออาหารหมดลงหรือมีการสะสมของเสียที่เป็นพิษเกิดขึ้นและอาจจะเกิดขึ้นจากทั้งสองสาเหตุ ดังนั้นกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระบบนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา แต่กระบวนการหมักแบบนี้ยังใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตทางอุตสาหกรรม โดยการปรับสภาพให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด (คุษณี ธนะบริพัฒน์, 2555) ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะ จะมีขั้นตอนการเจริญแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็นระยะ ๆ ได้ดังนี้

ระยะปรับตัว (Lag Phase) เป็นระยะที่เริ่มตั้งแต่การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหนึ่งลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่ง เป็นช่วงที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ช่วงนี้เซลล์จะมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและมีการสังเคราะห์เอนไซม์หรือโคเอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งช่วงนี้เซลล์จุลินทรีย์จะยังไม่มีการแบ่งตัว ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่น้ำหนักของเซลล์อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ แต่ในกรณีที่น่าเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญในระยะเพิ่มจำนวนมาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ จุลินทรีย์อาจเจริญได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านช่วงระยะปรับตัวได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และการถ่ายเชื้อในระยะเวลาที่ถูกต้องจะช่วยให้จุลินทรีย์มีการผลิตผลิตภัณฑ์แบบปฐมภูมิและแบบทุติยภูมิได้ผลดี

ระยะเพิ่มจำนวน (Log Phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ เซลล์จะมีองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมและสรีรวิทยาอื่น ๆ ที่เหมือนกัน เป็นระยะที่เซลล์มีประสิทธิภาพสูงสุด อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของสารอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง

ระยะคงที่ (Stationary Phase) เป็นระยะสารอาหารถูกใช้ไปจนหมดหรือมีการสะสมของสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เกิดขึ้น การเจริญของจุลินทรีย์จะช้าลงและอาจจะสิ้นสุดลง ซึ่งในระยะนี้อัตราการเจริญจะเท่ากับศูนย์ แต่จุลินทรีย์ยังคงมีชีวิตอยู่โดยอาศัยอาหารที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ ในระยะนี้เซลล์จะมีการสร้างสารหลายชนิดซึ่งมีการเก็บเกี่ยวและนำมาใช้ประโยชน์

ระยะลดจำนวน (Death Phase) ซึ่งระยะนี้จะเกิดขึ้นหลังจากระยะคงที่ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะใช้เวลาต่างกันในการเข้าสู่ระยะนี้ เป็นระยะที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มลดลง เนื่องมาจากการตายของเซลล์และการย่อยตัวเอง (Autolysis) โดยอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งอัตราการตายของเซลล์จุลินทรีย์จะใช้เวลาต่างกัน ไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

ในการเพาะเลี้ยงแบบกะจะไม่สามารถวัดความเข้มข้นของสารอาหารที่มีการเติมลงไปในการหมักตลอดเวลาได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการวัดปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของสารอาหารแทน เช่น การผลิตกรดอินทรีย์ และอัตราการเติมกลูโคสจะทราบได้จากการวัดค่าความเป็นกรดต่าง (คุษณี ธนะบริพัฒน์, 2555)

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไม่มาก
2. เชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงจะมีความแข็งแรง เนื่องจากการใช้กล้าเชื้อที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการกลายพันธุ์ยากอีกด้วย
3. การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย เนื่องจากไม่มีการเปิดระบบเพื่อนำสารอาหารเข้าหรือออก เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ จากภายนอกจึงเข้าสู่ระบบยาก

4. การควบคุมทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. ต้องเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นใหม่และวัตถุดิบอาหารใหม่ทุกครั้งที่ทำเนิการเพาะเลี้ยง ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย
2. ต้องเสีเวลารอเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง เนื่องจากเป็นหัวเชื้อที่เตรียมใหม่

2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch Cultivation)

การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะนี้เป็นระบบที่อยู่ระหว่างการหมักในอาหารเหลวแบบกะและแบบต่อเนื่อง เป็นการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปจนถึงหมักเป็นระยะ ๆ โดยไม่มีการถ่ายเทอาหารเก่าออกจากถังหมัก ดังแสดงในภาพที่ 1 (b) การหมักแบบนี้ก็ยังคงเป็นระบบปิด เช่นเดียวกับการหมักแบบกะ เนื่องจากมีการเติมอาหารใหม่เข้าแต่ไม่มีการไหลออกของอาหาร ผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบนี้จะดีกว่าการหมักแบบกะ (คุษณี ธนะบริพัฒน์, 2555)

ซึ่งเมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะจะมีการกำหนดค่าความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น จากนั้นจะมีการเติมอาหารลงไปอย่างต่อเนื่องเพื่อควบคุมความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ดังนั้นเมื่อมีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องปริมาณของเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้น กล

ยุทธ์และวิธีการเดิมที่ใช้โดยทั่วไปแล้วระยะเวลาการเจริญแบบ Log phase ในการเพาะเลี้ยงแบบเดิมจะนานกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะและจะทำให้ได้ภาวะเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณเซลล์สูง (High-cell-density) (สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร, 2559)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะในระดับอุตสาหกรรม คือ

ก. ควบคุมการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์และช่วยรักษาปริมาณออกซิเจนในถังหมัก

ข. ควบคุมไม่ให้สารพิษที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตของจุลินทรีย์

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบกะหลายประการเช่น

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

2. สามารถผลิตเซลล์ได้ที่มีความเข้มข้นสูง (High-cell concentration) เช่น อาจสูงถึง 80 กรัมต่อลิตรซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยทั่วไปนั้นจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 20 - 30 กรัมต่อลิตร

3. ช่วยลดผลจากกลูโคส (Glucose effect) คือ การที่เมื่อมีกลูโคสในระบบการเพาะเลี้ยงมากเกินไปส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสร้างเป็นสารอย่างอื่นขึ้นมาแทนการสร้างเซลล์ซึ่งสารที่สร้างขึ้นมานั้นอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เองได้

4. ช่วยลดความหนืดของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์แทรน พูลูลาน และแซนแทนกัม การค่อย ๆ เติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องนั้นสามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักได้ เนื่องจากสารอาหารที่ค่อย ๆ เติมลงไป ซึ่งจะเข้าไปช่วยเจือจางน้ำหมักที่มีความหนืดมากได้ ซึ่งหากความหนืดในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดกวนจะต้องใช้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้นเกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

5. สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากเป็นระบบที่มีเพียงการเติมสารอาหารเท่านั้น ทำให้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงนั้นไม่ถูกเจือจาง จึงทำให้ได้เปรียบมากกว่าเชื้อชนิดอื่น



2.4.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous Cultivation)

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะเป็นการหมักในระบบเปิด (Open System) เนื่องจากจะมีการไหลเข้าออกของสารอาหารภายในถังหมักตลอดเวลา การเพาะเลี้ยงแบบนี้เป็นการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เดียวกันมีการแยกเอาอาหารที่มีผลผลิตละลายอยู่ ออกมาตลอดเวลา โดยมีการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารเข้าและการนำอาหารออกจากถังหมัก ให้สมดุล ดังแสดงในภาพที่ 1 (c) (คุษณี ธนะบริพัฒน์, 2555)

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงในอาหารแบบต่อเนื่อง คือ

1. ถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็กกว่าถังหมักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ไม่เปลืองเนื้อที่ นอกจากนี้การใช้งานอย่างต่อเนื่องช่วยลดเวลาในการทำความสะอาดอุปกรณ์ ทำให้ประหยัดแรงงานและค่าใช้จ่าย
2. การเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในอัตราที่คงที่ในสภาพแวดล้อมที่คงที่ และการเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ได้สะดวก เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณออกซิเจน ให้อยู่ในระดับที่ต้องการได้ตลอดเวลา ทำให้ได้ผลผลิตแบบเดียวกันตลอด
3. ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องบางชนิด อัตราการเจริญของจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงและควบคุมได้ ซึ่งมีผลต่อการศึกษาถึงอิทธิพลของอัตราการเจริญที่มีต่อขนาดและองค์ประกอบของเซลล์

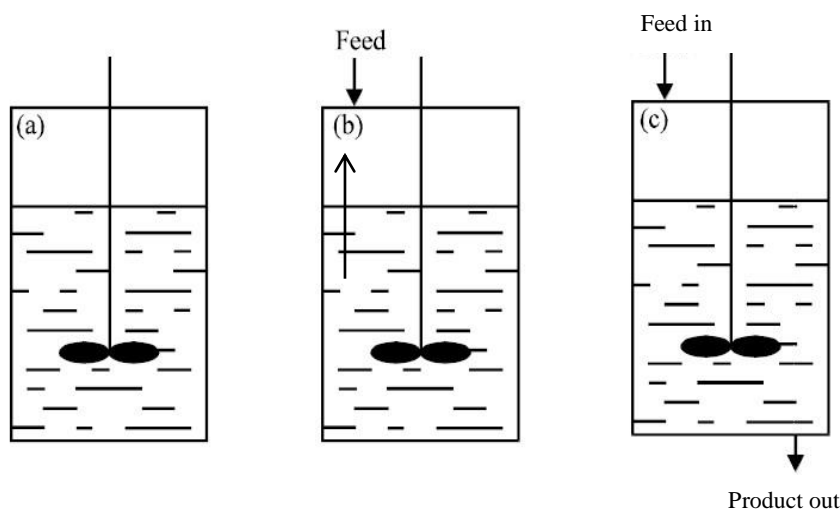
ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือ ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะนานกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ จึงมีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้มากกว่า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงให้ปลอดเชื้อมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอากาศที่ผ่านเข้าถังหมักจะต้องปราศจากเชื้อ นอกจากนี้อาจเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ๆ อีกด้วยซึ่งยากต่อการค้นพบ และอาจมีผลทำให้ผลผลิตลดลงด้วย

กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง สามารถทำได้หลายวิธี (คุษณี ธนะบริพัฒน์, 2555) เช่น

1. Single Stage Continuous Fermentation วิธีนี้จะเป็นการเลี้ยงในถังหมักเพียงถังเดียวและกระบวนการหมักจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยสมดุลของการนำเข้าของอาหารเลี้ยงเชื้อและการปล่อยออกของผลผลิต
2. Recycle Continuous Fermentation การหมักแบบนี้จะมีการนำเชื้อจุลินทรีย์บางส่วนหรือสารอาหารบางส่วนที่ยังไม่ได้ใช้และเหลืออยู่ กลับไปใช้ในถังหมักอีก
3. Multiple-Stage Continuous Fermentation เป็นกระบวนการหมักที่มี 2 ชั้นตอนหรือมากกว่าโดยแบ่งการทำงานเป็นระยะ ๆ ระยะของการเจริญของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นในถังหมักที่หนึ่ง

จากนั้นในถังหมักที่สองหรือถังหมักต่อ ๆ ไปจะเป็นระยะของการสังเคราะห์สาร วิธีนี้จะใช้ในกระบวนการหมักซึ่งระยะของการเจริญของจุลินทรีย์และการสังเคราะห์สารไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นหลังจากที่อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลง

ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีการหมัก 2 แบบ ได้แก่ Chemostat หรือ Turbidostat ใน Chemostat อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมด้วยปริมาณของสารอาหาร และเป็นระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ง่ายที่สุด ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้เลี้ยงเชื้อโดยมีภาชนะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ภาชนะนี้จะมีทางให้อากาศเข้าและออกมีช่องเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ใบบดกวนอากาศ ช่องที่จะให้จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อไหลออกภาชนะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะต่อเข้ากับภาชนะที่เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดภัย อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ ๆ จะถูกปั๊มเข้าไปในภาชนะเลี้ยงเชื้อหรือถังหมักโดยมีอัตราการไหลคงที่ อาหารที่ไหลเข้าไปในถังหมักจะถูกผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกควบคุมให้คงที่โดยปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้นจะถูกคูดออกจากถังหมัก การเลี้ยงเชื้อแบบนี้จะสามารถรักษาระยะของการเจริญในช่วง Log phase ได้เป็นเวลานานหลายวัน ส่วน Turbidostat เป็นการหมักอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการหมักแบบต่อเนื่อง ถังหมักชนิดนี้จะเป็นการควบคุมการทำงานจากภายใน โดยมีเครื่องมือวัดความขุ่นของเชื้อเป็นตัวควบคุมปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ ถ้าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักมีมากเกินไปจนเกินขีดจำกัด อัตราการไหลเข้าของอาหารเลี้ยงเชื้อสู่ถังหมักจะมากขึ้น และในทางตรงกันข้าม ถ้าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักลดน้อยลง อัตราการไหลเข้าของอาหารเลี้ยงเชื้อก็จะน้อยลง ซึ่งระบบนี้ต่างจาก Chemostat ที่เป็นระบบที่ควบคุมการทำงานจากภายนอก โดยควบคุมปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักให้คงที่ตลอดเวลา ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักแบบต่อเนื่องชนิดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน การเติมอาหารใหม่ลงไปในถังหมักในอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการที่จุลินทรีย์นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้และการนำออกจากถังหมัก จะทำให้เกิดสภาวะคงที่ (Steady State) ซึ่งจะทำให้ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่สมดุลกับปริมาณเซลล์ที่ถูกคูดออกไปจากถังหมัก ภายใต้สภาวะนี้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) จะเท่า ๆ กับอัตราการเจือจาง ($\sim D$) เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์



ภาพที่ 1 ชนิดของเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ

- (a) การเพาะเลี้ยงแบบกะ
- (b) การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ
- (c) การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

(Rashid, Hizbullah, Mohammad & Jakir H Khan, 2012)

2.5 การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง

วิธีการการเพาะเลี้ยงมีความสำคัญอย่างมากที่จะส่งเสริมให้การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงประสบความสำเร็จ เพราะว่ามีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตทั้งสภาวะทางสิ่งแวดล้อม และสภาวะธาตุอาหารที่เหมาะสมนอกจากจะส่งผลต่อการผลิตเซลล์แล้วยังส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย ดังนั้นวิธีการที่จะทำให้ประสบความสำเร็จต่อการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงจึงมีการพัฒนาเพื่อให้สามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงดังกล่าว (Shojaosadati, Kolaei, Babaeipour & Farnoud, 2008) ซึ่งมีวิธีการที่แตกต่างกัน ได้แก่

2.5.1 กลวิธีการเติมสารอาหารในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะเป็นกลวิธีที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงเนื่องจาก

1. สามารถขยายเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ (ซึ่งจะสำคัญมากกับการผลิตที่ปริมาณผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของเซลล์)
2. สามารถควบคุมสภาวะสำหรับกำหนดปริมาณของสารตั้งต้นและอัตราการใช้สารตั้งต้นในระหว่างการหมักได้

3. สามารถควบคุมการสร้างผลพลอยได้ เนื่องจากการควบคุมปริมาณของสารตั้งต้นให้เพียงพอกับความต้องการใช้ของจุลินทรีย์เท่านั้น

ในการเพาะเลี้ยงแบบเดิมๆ นั้น กลวิธีในการเติมสารอาหารถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดในการทำให้การเพาะเลี้ยงประสบความสำเร็จ (Shiloach and Fass, 2005) ซึ่งมีหลากหลายกลวิธีในการเติมสารอาหารที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ การใช้อัตราการเติมสารอาหารที่คงที่ (Constant Rate Feeding) การเติมสารอาหารแบบทีละขั้น (Stepwise Feeding) และการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential Feeding) เป็นต้น ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบเดิมๆ ประสบความสำเร็จ

- การเติมสารอาหารแบบคงที่ ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไปจนถึงหมัก จะเป็นไปตามอัตราที่กำหนดไว้ คือมีอัตราการเติมที่คงที่ตลอด และเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องและความเข้มข้นของเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ (Jensen and Carken, 1990)

- การเติมอาหารแบบทีละขั้น (Stepwise Feeding) เป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ โดยการเติมสารอาหารลงไปมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Jensen and Carken, 1990)

- การเติมอาหารแบบเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential Feeding) เป็นการเติมสารอาหารที่พัฒนาขึ้นมาจากความคิดที่ว่าเซลล์สามารถมีการเจริญโตแบบทวีคูณ (Exponential) ได้ ถ้าอัตราการเติมสารอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ซึ่งกลวิธีการเติมสารอาหารแบบนี้มีข้อดี คือช่วยลดการสร้างอะซิเตตในกระบวนการได้โดยการควบคุมอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะให้ต่ำกว่าค่าวิกฤติในการสร้างอะซิเตตมา (Babaeipour, Shojaosadati, Robotjazi, Khalilzadeh & Maghsoudi, 2007)

2.5.2 Two-Stage Cyclic Fed-Batch Process

เป็นการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเดิมๆ โดยการส่งถ่ายน้ำหมักในระยะเวลาที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโต (Growth Stage) ไปยังระยะที่เป็นการผลิต (Production Stage) แล้วเก็บไว้เพียงบางส่วนให้ยังคงอยู่ในระยะของการเจริญเติบโตต่อไป จากนั้นจึงเติมอาหารที่เตรียมไว้ก่อนหน้าจนเต็มปริมาตรที่ต้องการใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยใช้อัตราการเติมที่เหมาะสม ในขณะที่ส่วนที่ย้ายออกไปเพื่อให้เข้าขั้นของการผลิตผลิตภัณฑ์ คือ เหนียวน้ำให้ยื่นเกิดการแสดงออกและสร้างผลผลิตนั้นต้องมีการปรับสภาวะทั้งในเรื่องของ pH อุณหภูมิ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรือสูตรอาหาร ซึ่งสามารถจะควบคุมให้เหมือนหรือแตกต่างจากในขั้นของการเจริญเติบโตอย่างไรก็ได้

เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด (Chang, Ryu, Park, Kim, & Ogrydziak, 1998; Curless, Fu, Swank, Menjares, Fieschko, & Tsai, Curless, 1991)

2.5.3 Temperature Limit Fed-Batch (TLFB) Process

เป็นเทคนิคที่ควบคุมอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ด้วยอุณหภูมิ (Temperature Profile) ที่ค่อย ๆ ลดลงทีละน้อยมากกว่าที่จะควบคุมด้วย (Feeding Profile) ซึ่งมีสองกลไกที่ช่วยให้เทคนิคนี้สามารถมีการสะสมผลผลิตได้มากกว่า เนื่องจากเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis) น้อยลง เนื่องจาก 1. การใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่ำ

2. เซลล์มีอัตราการตายน้อยและปล่อยเอนไซม์โปรติเอส (Protease) สู่อาหารเพาะเลี้ยง (Jahic, Wallberg, Bollok, Garcia, & Enfors, 2003)

2.5.4 A-Stat

เป็นเทคนิคที่มีการทำงานร่วมกันระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Paalme, Kahru, Elken, Vanatalu, Tiisma, & Vilu, 1995) โดยอาศัยพื้นฐานการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ค่อย ๆ มีการเปลี่ยนแปลง (Smooth Change) ในช่วงแรกการเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะเหมือนกับ Chemostat คือเป็นการเพาะเลี้ยงในสภาวะคงที่ (Steady State) หลังจากนั้นระบบจะควบคุมอัตราการเจือจางให้มีการเปลี่ยนแปลงแบบค่อยเป็นค่อยไป ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของเวลายังคงมีการรักษาอัตราให้คงที่เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ A-stat นี้แสดงให้เห็นว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาปริมาณของเซลล์เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการบริโภคนสารตั้งต้นน้อยกว่าและเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่าเทคนิค Chemostat แบบดั้งเดิม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจะมีอัตราการเจือจางตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงแบบค่อยเป็นค่อยไปมากกว่าการเปลี่ยนแปลงแบบฉับพลัน (Paalme, Elken, Vilu, & Korhola, 1997)

2.5.5 Dialysis fermentation

การหมักแบบ Dialysis เป็นเทคนิคที่สามารถแก้ปัญหาในเรื่องการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยอะซิเตรต และสารอาหารอื่น ๆ เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงได้ซึ่ง Dialysis หมายถึงการแยกของโมเลกุลละลายน้ำต่าง ๆ โดยอาศัยการแพร่ที่ไม่เท่ากันของแต่ละโมเลกุลผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Semi Permeable Membrane) ที่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความเข้มข้นของแต่ละโมเลกุลรูปร่างของถังที่มีเป้าหมายในการเป็น (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 แบบดังเดิวนั้นไม่ค่อยเป็นที่นิยมในการนำมาใช้ เนื่องจากยากต่อการฆ่าเชื้อและไวต่อกลไกความเครียดและการจำกัดปริมาณออกซิเจนในการเพาะเลี้ยง (Fuchs et al., 2002)

2.5.6 Pressurized Cultivation

เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมอากาศรวมกับการเพิ่มความดันภายในถังมาใช้ร่วมกันเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ของเซลล์ แต่การเพิ่มความดัน โดยให้อัตราการเติมอากาศคงที่ในการเพาะเลี้ยงนั้นทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้น เป็นผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แต่หากมีการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศตลอดระยะเวลาที่มีการเพิ่มความดันนั้น จะสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนการใช้การเติมแก๊สออกซิเจนบริสุทธิ์ได้ ซึ่งมีราคาแพงไม่เหมาะกับการนำมาใช้งานจริง (Matsui, Shinzato, Yokota, Takahashi & Sato, 2006)

2.5.7 Perfusion Techniques

ลักษณะพื้นฐานของเทคนิคนี้ คือความคงที่ในการเติมอาหารเซลล์คงเหลือ (Retention Cell) และในบางครั้งอาจมีการคัดเลือกเซลล์ตายออกได้ เซลล์ที่เหลือนั้นจะได้มาจากการผ่านแผ่นเมมเบรน หรือจากการคัดแยก หรือได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ตายออก ซึ่งเทคนิคนี้ไม่นิยมนำมาใช้กับเซลล์จุลินทรีย์แต่ก็นิยมนำมาใช้กับเซลล์สัตว์ (Shojaosadati et al., 2008)

2.6 ปัจจัยที่ใช้ในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูง

การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูงนอกจากอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงในลักษณะต่าง ๆ แล้ว ยังมีปัจจัยที่สำคัญอีกสองประการ ได้แก่ ปัจจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบและความเข้มข้นของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสำคัญไม่ว่าจะเป็นแหล่งของคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และปัจจัยที่สองคือปัจจัยทางสภาวะทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ การกวนผสม และการเกิดฟอง เป็นต้น (Shojaosadati et al., 2008)

2.6.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง (Medium composition)

การเพาะเลี้ยงให้เซลล์ให้มีความเข้มข้นสูง องค์ประกอบและความเข้มข้นของอาหารในการเพาะเลี้ยงจะเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์มีความจำเป็นต้องใช้ในการเจริญ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการชนิดและปริมาณสารอาหารในการเจริญแตกต่างกัน

ออกไป อาหารชนิดหนึ่งอาจจะเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิด เมื่อพิจารณาถึงแหล่งพลังงานในการเจริญของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งจุลินทรีย์ได้เป็น จุลินทรีย์ที่ใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ในการเจริญเรียกว่า โฟโตทรอป (Phototroph) ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้สารเคมีเป็นแหล่งพลังงานเรียกว่า เคมีทรอป (Chemotroph) ถ้าจุลินทรีย์ใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานเรียกว่า ออร์แกโนทรอป (Organotroph) และจุลินทรีย์ใช้สารประกอบ อนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานเรียกว่า ลิโททรอป (Lithotroph) (วสุ ปฐมอารีย์, 2561) สำหรับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีดังนี้

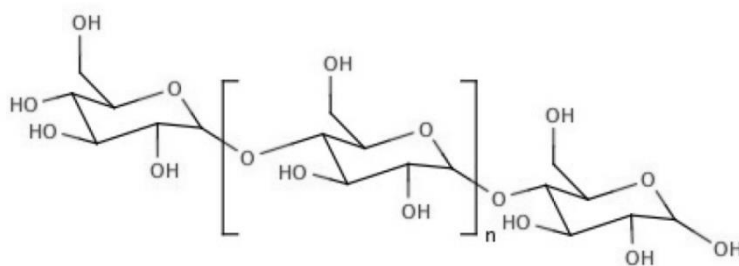
1. แหล่งคาร์บอน (C-source)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความจำเป็นในการสร้างพลังงานและเซลล์ ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 - 55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ ศิริโชค, 2555) คาร์บอนเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดไขมัน น้ำตาล และสารอินทรีย์อื่นๆ ภายในเซลล์ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องการคาร์บอนจากสารประกอบอินทรีย์ เรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า เฮเทอโรทรอป (Heterotroph) แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายแป้ง กลีเซอรอล หรือเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (วสุ ปฐมอารีย์, 2561)

โดยทั่วไปแล้วโพลีแซคคาไรด์จะไม่สามารถถูกนำมาใช้งานได้ทันที หรือนำไปใช้ได้ยาก ไม่เหมือนกับโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ แต่ก็สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงในจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟา เอนไซม์อะไมเลส โดยจะมีการปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์และย่อยให้กลายเป็นมอลโทส และกลูโคส ก่อนจะมีการลำเลียงเข้าเซลล์

เดกซ์ตริน (Dextrin)

เดกซ์ตริน เป็น โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) ที่เป็นพอลิเมอร์ประกอบไปด้วยกลูโคสที่เป็นหน่วยย่อยเชื่อมกันด้วยพันธะ α -1,4-glucosidic เป็นสายโซ่ตรงบางระดับมีการแตกแขนงที่บริเวณ 1,6-glucosidic มีสูตรทางเคมีเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ (BeMiller, 2003) เดกซ์ตรินได้จากการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลส เป็นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) แต่เนื่องจากเดกซ์ตรินมีบริเวณที่แตกแขนงบริเวณ 1,6-กลูโคซิดิก แอลฟาอะไมเลสเพียงชนิดเดียวไม่สามารถย่อยให้ได้เป็นกลูโคสได้หมด จึงต้องใช้ร่วมกับเอนไซม์อีกชนิดได้แก่ 1,6-กลูโคซิดเอส ที่สามารถย่อยพันธะดังกล่าวได้ จึงจะได้เป็นกลูโคสหรือมอลโทส



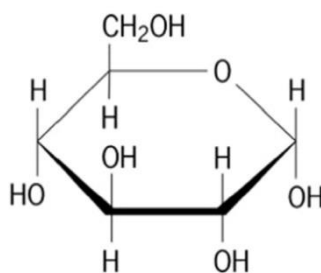
ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของเดกซ์ตริน

(Pasut, 2014)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะไม่สามารถย่อยสลาย หรือนำเดกซ์ตรินไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ได้ ยกเว้นจุลินทรีย์บางชนิดที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์จำพวก กลูโคสไมเลส ซึ่งสามารถปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเดกซ์ตรินให้ได้กลูโคสจึงสามารถนำกลูโคสไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ได้

กลูโคส (Glucose)

เป็นคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) ชนิดแอลโดส (Aldose) น้ำตาลกลูโคสที่พบอยู่ในรูป D-glucose ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) น้ำตาลกลูโคส อาจเรียกว่า dextrose (หมายถึง D-glucose) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยกัน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และสารเผาผลาญขั้นกลาง (Metabolic intermediate) กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (Cellular respiration) (สารานุกรมเสรี, 2561)



ภาพที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคส

(Ramasahayam, Koppuravuri, Arora & Chowdhury, 2015)

กลูโคสสามารถผลิตได้โดยการสลาย (Hydrolysis) แป้งที่มีเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยา วัตถุประสงค์ทางธรรมชาติมากมายสามารถใช้เป็นแหล่งของแป้งได้เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันเทศ และมันสำปะหลัง (Cassava) เป็นต้น กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ช่วยจะมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนแรก (Liquefaction) ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 90 - 100 องศาเซลเซียส เอนไซม์เหล่านี้จะย่อยแป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เล็กลง โดยจะมีโมเลกุลเป็นโอลิโกเมอร์ของกลูโคส 5-10 หน่วย

ขั้นตอนที่สองเรียกว่า แซคคาริฟิเคชัน (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะไฮโดรไลซ์ขึ้นอยู่กับเวลาของการย่อยโอลิโกเมอร์ให้ได้กลูโคสอย่างสมบูรณ์โดยใช้เอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) สภาพของปฏิกิริยาจะต้องควบคุมให้อยู่ที่ pH 4.0-4.5 อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจะต้องอยู่ที่ร้อยละ 30 - 50 โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวะการณ์เหล่านี้แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสมากกว่าร้อยละ 20 หลังจากใช้เวลา 48 ชั่วโมง (สารานุกรมเสรี, 2561)

2. แหล่งไนโตรเจน (N-source)

จุลินทรีย์ต้องการไนโตรเจนในการสร้างกรดอะมิโนและโปรตีนที่จำเป็นภายในเซลล์ โดยทั่วไปเซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 13 แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ ได้แก่ กรดอะมิโน กลีโกลินเตรค กลีโกลแอมโมเนียม และยูเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ใช้สารประกอบพวกเปปโตน (Peptone) ซอยโตน (Soytone) สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) และสารสกัดจากเนื้อ (Meat extract) เป็นแหล่งไนโตรเจน (วสุ ปฐมอารีย์, 2561) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึง

ขึ้นกับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบในโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยพิจารณาร่วมกับราคาของแหล่งในโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิต (สมาใจ ศิริ โภค, 2555)

3. แร่ธาตุหลัก (Macronutrients)

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จำเป็นต้องได้รับแร่ธาตุหลักมาใช้เป็นองค์ประกอบในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวน ซึ่งแร่ธาตุหลักที่ใช้ในการเจริญมีหลายชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และโซเดียม โดยฟอสฟอรัสจะเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกและฟอสโฟลิพิด ซึ่งจุลินทรีย์ได้รับฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟต นอกจากนั้นยังมีการใช้วิตามินเพื่อการเจริญหลายชนิด เช่น ไทอะมีน (Thiamine) และไบโอติน (Biotin) เป็นต้น แร่ธาตุบางประเภทที่จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้ในปริมาณน้อย ๆ เรียกว่า แร่ธาตุรอง (Trace Elements) ได้แก่ เหล็ก โคบอลต์ ทองแดง สังกะสี แมงกานีส และโมลิบดีนัม ซึ่งแร่ธาตุรองบางชนิดมีบทบาท เช่น เหล็กมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมและโปรตีน ที่จำเป็นในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron Transport Chain) เป็นต้น (วสุ ปฐมอารีย์, 2561)

4. สารกระตุ้นการเจริญ (Growth Factor)

สารกระตุ้นการเจริญเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับแร่ธาตุรอง เช่น วิตามิน กรดอะมิโน พิวรีน และไพริมิดีน เป็นต้น โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์สารกระตุ้นการเจริญเติบโตเองได้ แต่การเติมสารเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะช่วยให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วขึ้น และกระตุ้นการเจริญชนิด เช่น วิตามินจะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอื่น ๆ อีกด้วย (วสุ ปฐมอารีย์, 2561)

2.6.2 สภาวะทางกายภาพ (Physical conditions)

1. อุณหภูมิ (Temperature)

สำหรับการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง การควบคุมอุณหภูมิมีส่วนสำคัญเป็นอย่างมากเนื่องจากการปล่อยความร้อนภายในระบบจากการเพาะเลี้ยง โดยการถ่ายเทความร้อนในระบบนั้นมีการจำกัดเนื่องจากความหนืดของอาหารที่เพาะเลี้ยง ซึ่งจะต้องมีการรักษาอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงให้คงที่ตลอดเวลา เพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมมีส่วนจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ตลอดจนการสร้างผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ (Donovan, Robinson & Glick, 1996)

2. ออกซิเจน (Oxygen)

ในการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนสูงด้วยเช่นกัน เนื่องจากเซลล์ต้องการออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วค่าความเข้มข้นของการละลายออกซิเจน (Dissolved Oxygen) ในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความดัน

บรรยากาศที่ 1 atm จะมีค่าประมาณ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าหากต้องการให้มีปริมาณออกซิเจนเพิ่ม นอกจากจะให้โดยการเติมก๊าซออกซิเจนแล้วยังสามารถเพิ่มรอบการกวนผสมเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนได้เช่นกัน (Lee, 1996) นอกจากจะช่วยในการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเซลล์แล้วยังลดการสร้างผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น กรดซัคซินิก กรดอะซิติก กรดแลคติก เอทานอล ไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการภายในถังหมักอีกด้วย (Castan, Näsman & Enfors, 2002)

3. ค่าความเป็นกรด – ค่า

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีช่วงค่าความเป็นกรดต่างที่เจริญได้เฉพาะตัวโดยปกติจะเจริญได้ในช่วงความแตกต่างของค่าพีเอช 2 – 3 หน่วยพีเอช จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่มีช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5.5 - 8 และค่าพีเอชภายในเซลล์จะมีค่าเป็นกลางเสมอเพื่อป้องกันความเสียหายของกรดนิวคลีอิก โดยดีเอ็นเอจะถูกทำลายได้ในพีเอชกรดในขณะที่อาร์เอ็นเอจะเสียหายในสภาวะเป็นด่าง (วสุ ปฐมอารีย์, 2561)

4. คาร์บอน ไดออกไซด์ (Carbon dioxide)

คาร์บอน ไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ และการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง (Lee, 1996) ซึ่งอัตราการเติมสารอาหารที่จำกัดจะส่งผลให้มีปริมาณคาร์บอน ไดออกไซด์ที่สูงขึ้น และทำให้ความเข้มข้นของคาร์บอน ไดออกไซด์ภายในถังหมักเพิ่มสูงตาม การเพิ่มขึ้นของคาร์บอน ไดออกไซด์นี้จะส่งผลให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลงและกระตุ้นการสร้างกรดอะซิติกภายในถังหมัก ดังนั้นหากต้องการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงจะต้องมีการจัดการและควบคุมปริมาณของคาร์บอน ไดออกไซด์ในระบบให้ดี (Castan et al., 2002)

5. การกวนผสม (Mixing)

การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูง อัตราการกวนผสมมีผลอย่างมาก เนื่องจากเมื่อมีการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักเป็นระยะเวลาสั้น ส่งผลให้อาหารเพาะเลี้ยงมีความหนืดขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการสร้างเซลล์ลดลง และเมื่อมีการขยายขนาดของการเพาะเลี้ยงภายในถังหมักชีวภาพจะก่อให้เกิดความผันผวนของความเข้มข้นอาหารซึ่งจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่มีความเข้มข้นสูงและส่วนที่มีความเข้มข้นต่ำ โดยที่บริเวณที่มีความเข้มข้นของอาหารสูงจะมีความหนาแน่นของเซลล์สูงและอาจจะมีการสร้างผลพลอยได้ที่เป็นพิษภายในระบบได้ ดังนั้นการกวนผสมที่เหมาะสมจะทำให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง (Zhang, Li & Agblevor, 2005)

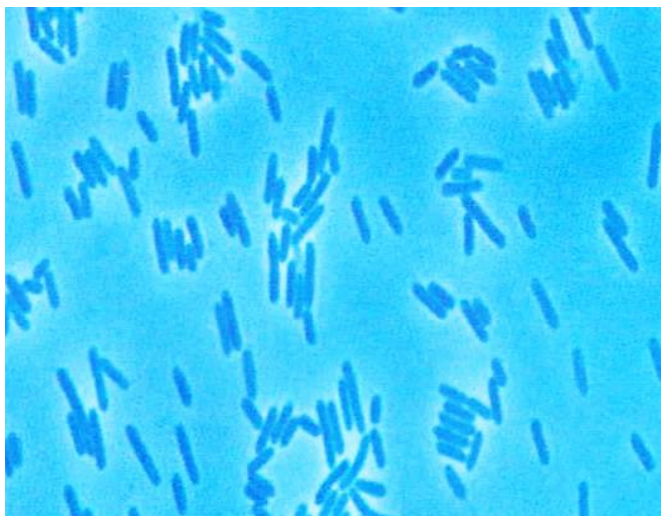
6. การเกิดฟอง (Foaming)

การเกิดฟองภายในระบบเป็นสาเหตุสำคัญต่อการควบคุมการเพาะเลี้ยงภายในถังหมัก โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงซึ่งหากเซลล์มีความเข้มข้นสูงผลที่ตามมาจะทำให้เซลล์ตายและเซลล์แตก (Cell lysis) เซลล์ที่ตายจะไปเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนภายในอาหาร

เพาะเลี้ยงส่งผลให้มีการเกิดฟอง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิควิธีการลดการเกิดฟองใหม่ที่เรียกว่า Stiring As Foam Disruption (SAFD) หลักการของเทคนิคนี้ คือ ลดชั้นฟองและเพิ่มการเคลื่อนที่ของเหลว โดยการกวนระหว่างชั้นของเหลวและก๊าซ (Hoeks et al., 2003) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไปจะควบคุมฟองโดยการใช้สารเคมีควบคุมฟอง (anti-foam)

2.7 จุลินทรีย์ *Bacillus* sp.

Bacillus sp. แบคทีเรียชนิดนี้มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก นับเป็นสายพันธุ์ที่ถูกเลือกเป็นสายพันธุ์ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ของจุลินทรีย์จำนวนมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถหลั่งสารประกอบต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นออกมานอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบคทีเรียในสกุลนี้มีเพียงไม่กี่สปีชีส์ที่เป็นเชือกก่อโรค ส่วนใหญ่มีความปลอดภัยต่อการนำมาใช้ เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามดินและสิ่งแวดล้อมทั่วไป เป็น aerobic bacteria ที่มีการสร้างสปอร์ได้เพื่อการอยู่รอดโดยสร้างเพียง 1 สปอร์ใน 1 เซลล์เท่านั้น และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod shaped) อาจมีแบบเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5 - 2.5 x 1.2 - 10 ไมโครเมตร (Rosovitz, Voskuil & Chambliss, 1998) สามารถเจริญโดยมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ในอาหารหลายชนิดอุณหภูมิปกติเป็นอุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และกรดต่างที่เป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น โปรติเอส (Protease) อะไมเลส (Amylase) เบต้า-กลูคาเนส (β -glucanase) และเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) ใช้ฟเลกเจลลาในการเคลื่อนที่ การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความแตกต่างกันอย่างมาก เฟอร์เซ็นต์ G+C content มีความแปรปรวนตั้งแต่ 33 เฟอร์เซ็นต์ จนถึง 69 เฟอร์เซ็นต์ ใน *B. thermocatenuatus* ซึ่งสูงกว่าลักษณะภายในสกุล ซึ่งความแปรปรวนปกติของลักษณะภายในสกุลไม่ควรมากกว่าร้อยละ 15 (Rosovitz et al., 1998)



ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ *Bacillus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุเชื้อ 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 100X (กัญญาวีร์ คุณคำ, 2561)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* sp.

Bacillus sp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาอย่างมาก ลักษณะโคโลนีอาจจะมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณของอาหารเพาะเลี้ยง อายุของโคโลนี และจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เพาะเลี้ยงมีผลต่อขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ดังนั้นจึงมีความยุ่งยากในการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีก็ยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ เช่น เมื่อเลี้ยงในอาหาร casein agar เชื้อ *B. megaterium* โคโลนีมีสีเหลือง เชื้อ *B. licheniformis* โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาล เชื้อ *B. sphaericus* โคโลนีสีชมพูและเชื้อ *B. subtilis* โคโลนีสีชมพู เหลือง ส้ม หรือน้ำตาล เซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ประกอบด้วย cytoplasmic membrane และผนังเซลล์ในบางสายพันธุ์ เซลล์ของ *Bacillus* sp. ไม่มีชั้น outer membranes ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนหลายชั้น anionic polymers ทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียว บริเวณผิวหนังของผนังเซลล์เป็นชั้นของ paracrystalline cell wall surface layers (S layers) ประกอบด้วยโปรตีน หรือ glycoprotein (Rosovitz et al., 1998)

แหล่งที่อยู่ของเชื้อ *Bacillus* sp.

Bacillus sp. สามารถพบได้ในธรรมชาติทั่วไป เช่น ในดิน แหล่งน้ำ อากาศ พืช เศษซากพืช ในอาหาร นม และธัญญาหาร (Claus & Berkeley, 1986) *Bacillus* sp. สามารถพบได้ทุก

สภาพแวดล้อมเพราะสปอร์ที่สร้างทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้ชนิดของ *Bacillus* sp. มีความหลากหลาย เช่น ต้องการออกซิเจน (aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง (facultative anaerobes) เจริญได้ในสภาพกรด (acidophiles) สภาพด่าง (alkalophiles) สภาพที่มีความเค็ม (halophiles) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) อุณหภูมิสูง (thermophiles) และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (chemolithotrophs) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญอยู่ในดิน แต่บางครั้งพบ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* พบในน้ำทะเลและน้ำกร่อยอีกด้วย (Rosovitz et al., 1998)

ความสำคัญด้านอุตสาหกรรมของเชื้อ *Bacillus* sp.

Bacillus sp. ผลิตเอนไซม์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (protease) และไลเปส (lipase) (สมใจ ศิริ โภค, 2555) เอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เบียร์ เนยแข็ง อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก และใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นต้น *B. acidocaldarius* และ *B. licheniformis* CMUC305 ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่ย่อยสลายพันธะ α -1, 4 glucosidic linkage ทนความร้อนสูง และคงทนต่อความเป็นกรด-เบส ในช่วงกว้าง มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร การย่อยแป้ง การผลิตแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมทอผ้า เอนไซม์ไลเปส ที่ย่อยสลายไขมันพวกไตรกลีเซอไรด์ โดยไฮโดรไลสัพันธะเอสเตอร์ของกลีเซอรอล (glycerol-ester hydrolase) ให้กรดไขมันและกลีเซอรอล ใช้มากทั้งอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การสังเคราะห์กลิ่นและรส กรดไขมันและ อุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น

นอกจากนี้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ยังมีบทบาทในการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในแหล่งชุมชน และยังมีสาร subtilisins ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. หลายชนิด ใช้ในการทำความสะอาด contact lens และอุตสาหกรรมอื่น ๆ เอนไซม์อื่นที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนม แป้ง เครื่องดื่ม และอาหาร (Zukowski, 1992)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ ขวัญฤทัย มาลัยเรืองและ เศรษฐวัชร นำศาสตร์ (2557) ที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบ 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* และ *S. cerevisiae* เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงโดยใช้สูตรอาหาร Batch Production medium (BPM) โดยใช้โอลิโกเมอร์ของกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (เดกซ์ทริน) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง และได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงแบบกะไปสู่เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่องที่มีศักยภาพสูง พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคดังกล่าว 3 ครั้งต่อเนื่องกัน

ทำให้มีอัตราผลิตเซลล์ *E. coli* ได้ถึง 2.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงโดยใช้ เดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตเซลล์ *S. cerevisiae* เท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเคียงได้กับการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ (fed- batch cultivation) ที่มีวิธีการที่ยุ่งยากมากกว่า

Vuolanto, Weymarn, Kerovu, Ojamo and Leisola, (2001) เป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฟเตส (Phytase) ซึ่งใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูง โดยใช้รีคอมบิแนนซ์ *Bacillus subtilis* ที่มีพลาสมิด pGT44 [phyC] ซึ่งมียีนไฟเตส และที่โปรโมเตอร์ *pst* การเพาะเลี้ยงนี้จะใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยงที่ 2 ลิตรในถังหมักชีวภาพ และมีการควบคุมการเติมน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีการทดสอบแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ เปปโตน (peptone) และ ยีสต์สกัด (yeast extract) ซึ่งผลของการใช้เปปโตนให้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร และผลของการใช้ยีสต์สกัดให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 56 กรัมต่อลิตร ซึ่งการทดลองนี้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ และให้ผลผลิตกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงถึง 48 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ในปี 2005 (Shiloach & Fass, 2005) ได้มีการรวบรวมการศึกษาเซลล์ความเข้มข้นสูงโดยใช้ *E. coli* เป็นต้นแบบเพื่อการผลิตโปรตีน โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงจากการรวบรวมวิธีการตั้งแต่ปี 1970 การเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์สูงจะส่งผลให้ประสบความสำเร็จต่อการผลิตผลิตภัณฑ์จากการเพาะเลี้ยงสูงเช่นกัน ซึ่งก็ได้มีการพัฒนาปรับปรุงวิธีการและเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกับการจัดการกับจุลินทรีย์ การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงทั้งการเพาะเลี้ยงแบบกะ การเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ และ การเพาะเลี้ยงแบบ dialysis ร่วมกับการจัดการจุลินทรีย์ ได้แก่ การเจริญของจุลินทรีย์ สภาวะที่เหมาะสมทั้งองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมตลอดจนกระบวนการทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะสร้างเซลล์จุลินทรีย์ของ *E. coli* ให้ความเข้มข้นสูงถึง 190 กรัมต่อลิตร

Babaeipour et al. (2007) ได้มีการศึกษาพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงจากเทคนิคเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะสำหรับการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนซ์ *E. coli* เพื่อผลิตโปรตีนอินเตอร์เฟอรอนของมนุษย์ (hIFN- γ) ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบเดิมกะถือว่าประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี ทำให้ได้ความเข้มข้นของชีวมวลสูงประมาณ 115 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง) และได้ hIFN- γ ถึง 42.5 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงมา 16.5 ชั่วโมง

El-Enshasy and El-Shereef, (2008) ได้มีการศึกษาการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces boulardii* ที่มีความทนต่อความแห้งแล้ง เพื่อในไปใช้ประโยชน์ในด้านการบำบัดทางชีวภาพ โดยทดสอบอาหารเพาะเลี้ยงสามชนิดได้แก่ complex media (YMG media), complete

defined media และ semi-defined media ทั้งในระดับการเขย่าในพลาสติกและถังหมัก ซึ่งพบว่าอาหารชนิด complete defined media ที่มีการเติมยีสต์สกัดเพิ่ม สามารถได้เซลล์ความเข้มข้นสูงถึง 5.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยมีการเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม พบว่าได้เซลล์ความเข้มข้นสูงถึง 18 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 20 ชั่วโมง และเมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ร่วมกับยีสต์สกัดระหว่างการเติมกลูโคส พบว่าจะได้เซลล์ความเข้มข้นสูงที่สุดถึง 84 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 37 ชั่วโมง

Kwon et al. (2011) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงเพื่อการผลิตเอนไซม์ nattokinase จากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่มีการเติมสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและเปปโตเนเพื่อศึกษาอัตราส่วนการผสมที่เหมาะสมตั้งแต่ 0.2 ถึง 5 กรัมของกลูโคสต่อเปปโตเนที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงและการผลิตเอนไซม์ ซึ่งพบว่าอัตราส่วนระหว่างกลูโคสและเปปโตเนที่ 0.2 กรัมกลูโคสต่อเปปโตเน ให้ความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 77 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเซลล์จะลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของกลูโคสต่อเปปโตเน และที่อัตราส่วน 0.33 กรัมกลูโคสต่อกรัมของเปปโตเนเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ nattokinase สูงถึง 14,500 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Zhang et al. (2011) ได้ศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงเพื่อการผลิต 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG) ของเชื้อ *Ketogulonicigenium vulgare* และ *B. megaterium* โดยใช้ผงจากน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor powder; CSLP) เป็นแหล่งไนโตรเจนและนำ CSLP ไปวิเคราะห์หองค์ประกอบพบว่ามียีสต์กรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุ เมื่อนำแต่ละองค์ประกอบมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาผลความสัมพันธ์ของชีวมวลและผลิตภัณฑ์ 2-KLG พบว่า ไกลซีน (Glycine) ให้ผลดีที่สุดตามด้วยซีรีน (Serine), ไบโอติน (Biotin), โพรลีน (Proline), กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) และทรีโอนีน (Threonine) และเมื่อนำมาผสมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงซีรีน 0.28 กรัมต่อลิตร, ไกลซีน 0.36 กรัมต่อลิตร, ทรีโอนีน 0.18 กรัมต่อลิตร, โพรลีน 0.28 กรัมต่อลิตร, กรดนิโคตินิก 0.19 กรัมต่อลิตร และไบโอติน 0.62 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงได้ถึง 4.2×10^9 cfu ต่อมิลลิลิตร และได้ความเข้มข้นของ 2-KLG เท่ากับ 58 กรัมต่อลิตร

Kanjanachumpol, Kulpreecha, Tolieng and Thongchul, (2013) ได้ศึกษาการพัฒนาการผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูงของเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ซึ่งใช้การเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7 อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของยูเรียที่คำนวณจากคาร์บอนต่อ



ไนโตรเจนเท่ากับ 10 ต่อ 1 กรัม ให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 32.48 กรัมต่อลิตรและน้ำหนักของ PHB ได้ร้อยละ 26.94 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ใช้กากน้ำตาลและยูเรียในอัตราส่วน 12.5 ต่อ 1 กรัม สามารถให้ความเข้มข้นสูงถึง 90.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB ร้อยละ 45.84

Zhong et al. (2014) ได้ทำการศึกษาการเติมอาหารเพื่อพัฒนาและปรับปรุงการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะเพื่อการผลิต jian-peptide (JAA) ซึ่งมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคส ไนโตรเจน และน้ำหนักเซลล์แห้งในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 30.70 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นไนโตรเจนที่ 1.68 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงถึง 77.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงกะถึงร้อยละ 73



2820514691

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius cp 224s บริษัท Sartorius Mechanics ประเทศเยอรมนี
2. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) รุ่น C25 KC Classic Incubator Shaker บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น Memmert BE 200 บริษัท Memmert GmbH & Co. ประเทศ เยอรมนี
4. ตู้แช่แข็ง (Freezer) รุ่น Sanyo SF 492 บริษัท Sanyo Gallenkamp PLC ประเทศอังกฤษ
5. ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น Memmert model 500 บริษัท Memmert GmbH & Co. ประเทศ เยอรมนี
6. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น Julabo TW20 บริษัท Julabo ประเทศ สหรัฐอเมริกา
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น GVC Cinta 40 บริษัท GBC Scientific Equipment ประเทศออสเตรเลีย
8. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Micro centrifuge (MSE) บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter) รุ่น Basic บริษัท Denver Instrument ประเทศ สหรัฐอเมริกา
10. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น WEST 4100+ บริษัท Astoll Scientific ประเทศ สหรัฐอเมริกา
11. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
12. ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตรพร้อมชุดควบคุม รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมนี
13. ถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 300 ลิตร พร้อมชุดควบคุม
14. เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer)
15. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) ขนาดบรรจุ 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร
16. ปิเปต (Auto Pipette)

17. บัฟเฟิลพลาสติก (Buffled Flask) ขนาด 500 และ 250 มิลลิลิตร
18. เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์

2. สารเคมี

- 2.1 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)
- 2.2 กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3, 5-Dinitrosalicylic acid: DNS)
- 2.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 2.4 กรดบอริก (Boric acid)
- 2.5 กลูโคส (Glucose)
- 2.6 คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)
- 2.7 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)
- 2.8 โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2)
- 2.9 ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO_4)
- 2.10 โซเดียม โมลิบเดต (Na_2MoO_4)
- 2.11 โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 2.12 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
- 2.13 นิกเกิลซัลเฟต (NiSO_4)
- 2.14 ผงวุ้น (Agar)
- 2.15 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 2.16 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 2.17 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 2.18 แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)
- 2.19 สารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นร้อยละ 40 (ภาคผนวก ก)
- 2.20 สารละลายเด็กซ์ทรินที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นร้อยละ 40 (ภาคผนวก ก)
- 2.21 สารละลายฟีนอล
- 2.22 แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]
- 2.23 แอมโมเนียมเฟอริกซิเตรต $(\text{NH}_4)_3[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$
- 2.24 แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)



2820514691

BUU-IThesis 59910006 thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

3. สูตรอาหาร (ภาคผนวก ก)

1. สูตรอาหาร BPM (Batch Production Medium) (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)
2. สูตรอาหาร NB (Nutrient Broth)
3. สูตรอาหาร Schaeffer's medium (Schaeffer, Millet and Aubert, 1965)

4. เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. คัดแยกจากดิน (พรพรรณ พรหมพันธุ์, 2552)

5. วิธีการวิจัย

5.1 การเตรียมหัวเชื้อ

5.1.1 ทำการถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีการเก็บรักษาในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาละลายและเทใส่อาหารเหลว NB ที่เตรียมไว้ใน ฟลาสก์

5.1.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5.1.3 นำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นของการทดลองต่อไปทั้งหมด

5.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสูตรอาหารสูตร BPM ต่อการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ในระดับ ฟลาสก์

การศึกษาประสิทธิภาพของสูตรอาหาร BPM (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่น่าสนใจสำหรับการทดลองในครั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับอาหารสูตร NB ที่เป็นสูตรอาหารมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไป และอาหารสูตร Schaeffer's medium ที่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง (Schaeffer et al., 1965) ดำเนินการตามวิธีดังต่อไปนี้

5.2.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร NB, BPM และ Schaeffer's medium โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 ใส่ลงในบัพเฟิลฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 95 มิลลิลิตร โดยเตรียมอาหารสูตรละ 3 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่า

เชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันของไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5.2.2 เติมห้วเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 ปริมาตรหัวเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร (คิดเป็น ร้อยละ 5) ลงในแต่ละพลาสติก

5.2.3 ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตรา การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

5.2.4 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร และนำมาทำการวิเคราะห์ผล การทดลอง ดังข้อที่ 5.7 ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

5.3 การศึกษาการประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่ง คาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ในระดับพลาสติก

การศึกษาระสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยการ เปรียบเทียบกับแหล่งของคาร์บอนอื่น ๆ ได้แก่ กลูโคสทางการค้า และกลูโคสจากการย่อยแป้งมัน สำปะหลัง ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ดำเนินการตามวิธีดังต่อไปนี้

5.3.1 เตรียมอาหารสูตร BPM โดยแทนที่แหล่งคาร์บอนในสูตร ด้วยกลูโคสทาง การค้า กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ที่ความ เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.5 และใส่ลงในบัพเฟิลพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 95 มิลลิลิตร โดยเตรียมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันอย่างละ 3 พลาสติก จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5.3.2 เติมห้วเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 ใช้ปริมาณ 5 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 5) ลงในแต่ละพลาสติก

5.3.3 ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตรา การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

5.3.4 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร และนำมาทำการวิเคราะห์ผล การทดลอง ดังข้อที่ 5.7 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

5.4 การศึกษาการใช้เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นสูง ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการใช้เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ดำเนินการตามวิธีดังต่อไปนี้

5.4.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร BPM ซึ่งแทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยเดกซ์ตรินที่ระดับความเข้มข้น 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยแยกส่วนของเดกซ์ตรินซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนออกเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่างหาก เทอาหารสูตร BPM ที่เตรียมไว้ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ปริมาตรการทำงานรวมทั้งหมด 3 ลิตร)

5.4.2 ทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิวัดค่า pH เท่ากับ 6.5 และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำพร้อมตั้งค่าสภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมักตามสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. (ภาพที่ 5)

5.4.3 นำถังหมักที่บรรจุอาหารแล้วมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ส่วนเดกซ์ตรินแยกออกมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.4.4 ทำการติดตั้งและตั้งค่าอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เข้าที่อีกครั้ง ปรับการตั้งค่าความเร็วของใบพัดในการกวนเป็น 500 - 700 รอบต่อนาที เติมอากาศ 1 - 3 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักต่อนาที (vvm)

5.4.5 เติมเดกซ์ตรินที่แยกฆ่าเชื้อลงในถังหมักแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกล้าเชื้อจากข้อ 5.1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร โดยปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงในถังหมัก (ปริมาตร 150 มิลลิลิตร)

5.4.6 เก็บตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



ภาพที่ 5 การจัดเตรียมถังหมักขนาด 5 ลิตร สำหรับเพาะเลี้ยงแบบกะ

5.5 การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบกะที่ระดับถังหมัก 30 ลิตร

การทดลองนี้จะทำการการศึกษาการขยายขนาดของการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงจากระดับถังหมัก 5 ลิตร เป็น 30 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.5.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร BPM ซึ่งแทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยแยกส่วนของเดกซ์ทรินซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนออกเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่างหาก เทอาหารสูตร BPM ที่เตรียมไว้ลงในถังหมักขนาด 30 ลิตร (ปริมาตรการทำงานรวมทั้งหมด 15 ลิตร)

5.5.2 ทำการเปรียบเทียบอุปกรณ์วัดค่า pH เท่ากับ 6.5 และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำพร้อมตั้งค่าสภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมักตามสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. (ภาพที่ 6)

5.5.3 ถังหมักที่บรรจุอาหารแล้วจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อต้มไอน้ำ (Boiler) ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ส่วนเดกซ์ตรินแยกออกมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

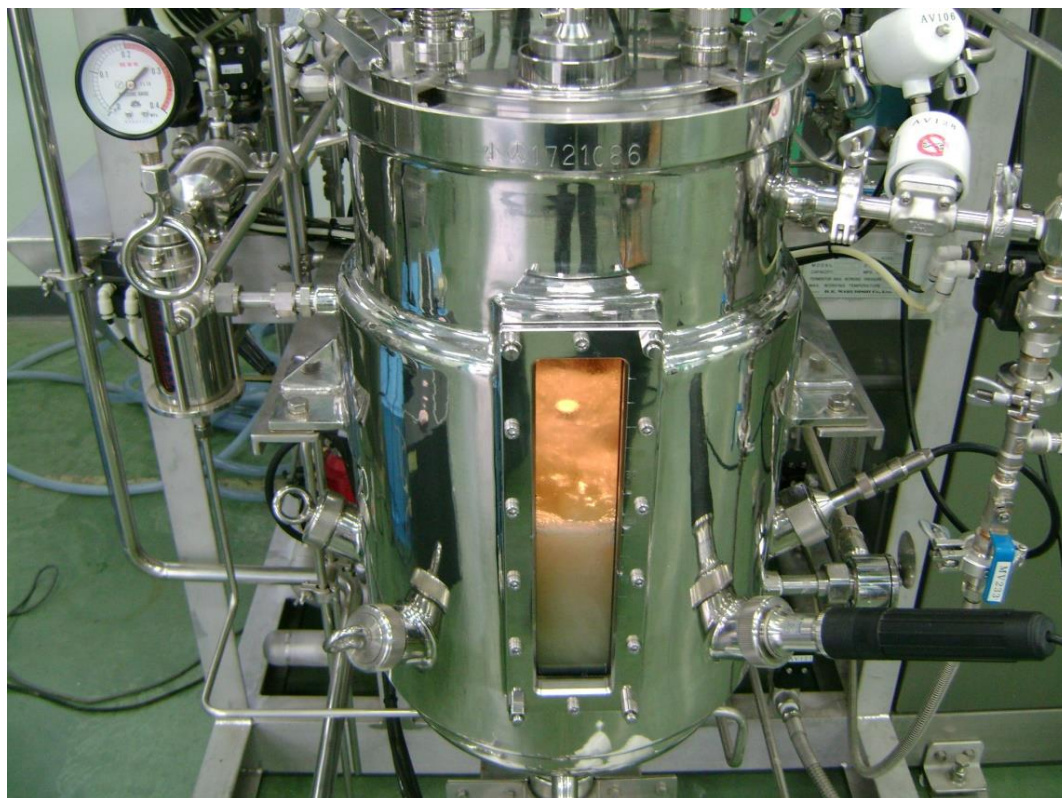
5.5.4 ทำการติดตั้งและตั้งค่าอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เข้าที่อีกครั้ง ปรับการตั้งค่าความเร็วของใบพัดในการกวนใน 6 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จากนั้นจะปรับเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักต่อนาที (vvm)

5.5.5 เติมเดกซ์ตรินที่แยกฆ่าเชื้อลงในถังหมักแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกลีเซอรีน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร โดยปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงในถังหมัก (ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร)

5.5.6 เก็บตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อครั้ง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง ตัวอย่างจากการทดลอง 3 ซ้ำ



2820514691



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 30 ลิตร

5.6 การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบกะที่ระดับถังหมัก 300 ลิตร

การทดลองนี้จะทำการศึกษาการขยายขนาดของการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงจากระดับถังหมัก 5 ลิตร เป็น 300 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.6.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร BPM ซึ่งแทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยเดกซ์ทรินที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยแยกส่วนของเดกซ์ทรินซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนออกเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่างหาก เทอาหารสูตร BPM ที่เตรียมไว้ลงในถังหมักขนาด 300 ลิตร (ปริมาตรการทำงานรวมทั้งหมด 200 ลิตร)

5.6.2 ทำการเปรียบเทียบอุปกรณ์วัดค่า pH เท่ากับ 6.5 และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำพร้อมตั้งค่าสภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมักตามสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.

5.6.3 ถังหมักที่บรรจุอาหารแล้วจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อต้มไอน้ำ (Boiler) ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ส่วนเดกซ์ทรินแยกออกมา นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.6.4 ทำการติดตั้งและตั้งค่าอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เข้าที่อีกครั้ง ปรับการตั้งค่าความเร็ว ของใบพัดในการกวนใน 6 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 100 รอบต่อนาทีและปรับเป็น 300 รอบต่อนาทีตลอด การเพาะเลี้ยง อัตราการเติมอากาศ 2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักต่อนาที (vvm)

5.6.5 เติมเดกซ์ทรินที่แยกฆ่าเชื้อลงในถังหมักแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกล้ำ เชื้อความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร โดยปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงในถังหมัก (ปริมาตร 20 ลิตร)

5.6.6 เก็บตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อครั้ง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ พร้อมทั้ง บันทึกรูปผลการทดลอง ตัวอย่างจากการทดลอง 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 การเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร

5.7 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.7.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ทุก ๆ 3 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ในระดับฟลาस्क ทำการเก็บใส่ลงในหลอดฝาเกลียวจำนวน 3 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร ในขณะที่การเก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักจะเก็บตัวอย่างครั้งละ 20 มิลลิลิตร ซึ่งเก็บตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวจำนวน 3 หลอด จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -4 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และนำมาใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

5.7.2 การวัดค่าความขุ่น (Optical Density)

นำน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงมาทำการวัดค่าความขุ่น หากน้ำหมักมีความเข้มข้นมากเกินไป นำน้ำหมักไปทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ซึ่งต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ไม่เกิน 0.5) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

ค่าความขุ่น (OD) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร x ค่าการเจือจาง

5.7.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว (ค่าน้ำหนักหลอดเปล่า) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก ซึ่งจะได้เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งรวมกับน้ำหนักของหลอด ดังนั้นจึงสามารถหาเฉพาะน้ำหนักเซลล์แห้งได้ โดยคำนวณตามสูตร ดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) = (น้ำหนักเซลล์ + น้ำหนักหลอด) - น้ำหนักหลอด

5.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (Reducing Sugar Analysis)

โดยวิธี DNS

1. การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เจือจางใส่ในหลอดทดลองด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นต่ออีก 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานกับค่า OD ที่วัดได้ จากนั้นหาความชันของกราฟ และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. การวัดตัวอย่างน้ำตาลคงเหลือ

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแล้วเฉพาะส่วนใส มาทำการเจือจางให้เหมาะสม นำส่วนใสที่มีการเจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย DNS (การเตรียมสารละลาย DNS ตามภาคผนวก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นต่ออีก 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นพาราฟิน เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลคงเหลือโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส}}$$

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of Variance; ANOVA) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลองแต่ละชุด ด้วยวิธี Tukey's studentized range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Minitab version 17 ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 0.05$

7. การคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์

ในการคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (เศรษฐวัชร นำศาสตร์, 2557) ได้มีการคำนวณค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

7.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ)

การเจริญในระยะเวลาทวีคูณ (log phase หรือ Exponential phase) เมื่อเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์แบบกะ จะเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ และมีบทบาทต่อการเจริญ มากที่สุด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (dx) ในระยะเวลาที่จำกัด (dt) จึง สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\begin{aligned} dx/dt &= \mu x \quad \text{หรือ} \\ dN/dt &= \mu N \end{aligned} \quad (1)$$

เมื่อ	x	=	ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (กรัมเซลล์ต่อลิตร)
	N	=	จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อลิตร)
	t	=	เวลา (ชั่วโมง)
	μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) มีหน่วยเป็นชั่วโมง

$$\text{หรือจัดรูปใหม่ } \mu = 1/x(dx/dt) \quad (2)$$

ในระยะเวลาการเจริญแบบทวีคูณ อัตราการเจริญจำเพาะหรือ μ มีค่าคงที่ สามารถอินทิเกรตโดยตรงต่อสถานะเริ่มต้นโดย $x = x_0$ ที่ $t = 0$ จากสมการ (1) จะได้

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

เมื่อ	x_0	=	ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น
	x	=	ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง
	e	=	ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (4)$$

7.2 สัมประสิทธิ์มวลเซลล์ (Yield coefficient)

$$Y_{x/s} = \Delta x / \Delta y$$

เมื่อ	$Y_{x/s}$	=	ผลได้ของมวลเซลล์จากมวลสับสเตรท (กรัมต่อกรัม)
	Δx	=	เปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)
	Δy	=	การใช้สับสเตรท (กรัมต่อลิตร)

7.3 อัตราการสร้างมวลเซลล์ (Specific rate of cell biomass productivity)

$$r_x = dx / dt$$

$$= (x - x_0) / t$$

เมื่อ	r_x	=	อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
	x_0	=	ปริมาณมวลเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	x	=	มวลเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปตามหน่วยเวลา (กรัมต่อลิตร)
	t	=	เวลา (ชั่วโมง)

7.4 อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (Specific substrate uptake rate)

$$r_s = dS / dt$$

$$= S_0 - S / t$$

เมื่อ	r_s	=	อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
	S_0	=	ปริมาณสารอาหารเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	S	=	สารอาหารที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)
	t	=	เวลา (ชั่วโมง)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) ต่อการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ในระดับฟลาस्क

จากการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารสูตร BPM สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง โดยทำการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับอาหารสูตร NB ซึ่งเป็นอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปและอาหารสูตร Schaeffer's เป็นสูตรอาหารที่มีการนำมาศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Bacillus* sp. ให้ได้ความเข้มข้นสูง โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 ของปริมาณอาหาร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

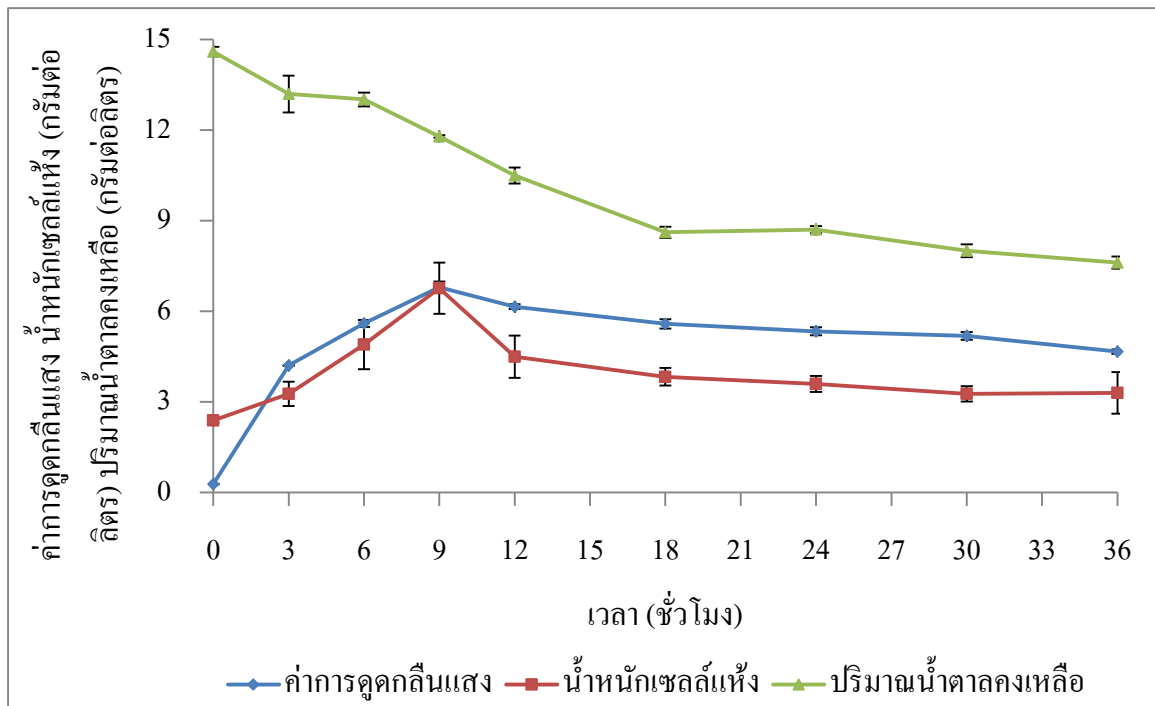
เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้สูตรแตกต่างกันทั้งสามสูตร โดยในอาหารสูตร BPM ดังภาพที่ 8 เห็นได้ว่าเชื้อ *Bacillus* sp. นั้น เจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 9 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 12 และลดลง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.80 และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.77 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลคงเหลือพบว่า ลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีแนวโน้มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้าย ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ 7.62 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB ดังภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Bacillus* sp. มีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 9 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.21 และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลคงเหลือพบว่า มีปริมาณประมาณ 0 กรัมต่อลิตร คงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

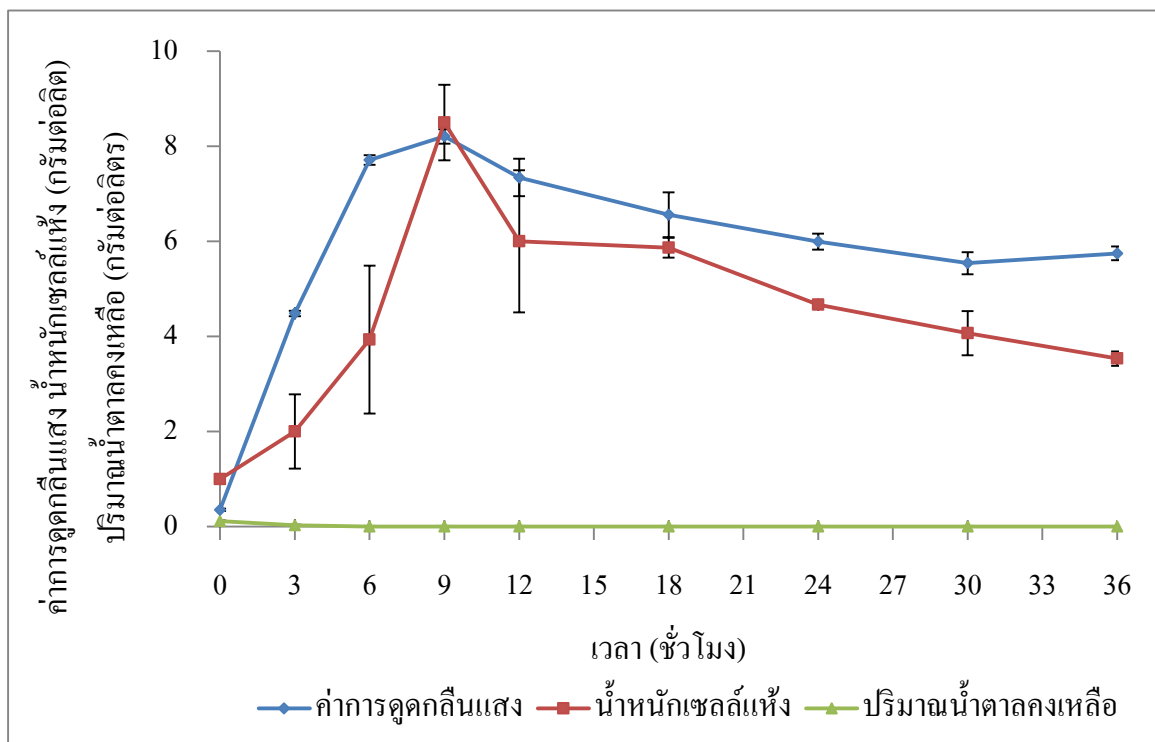


2820514691

BUU_1Thesis 59910006 thesis / recv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

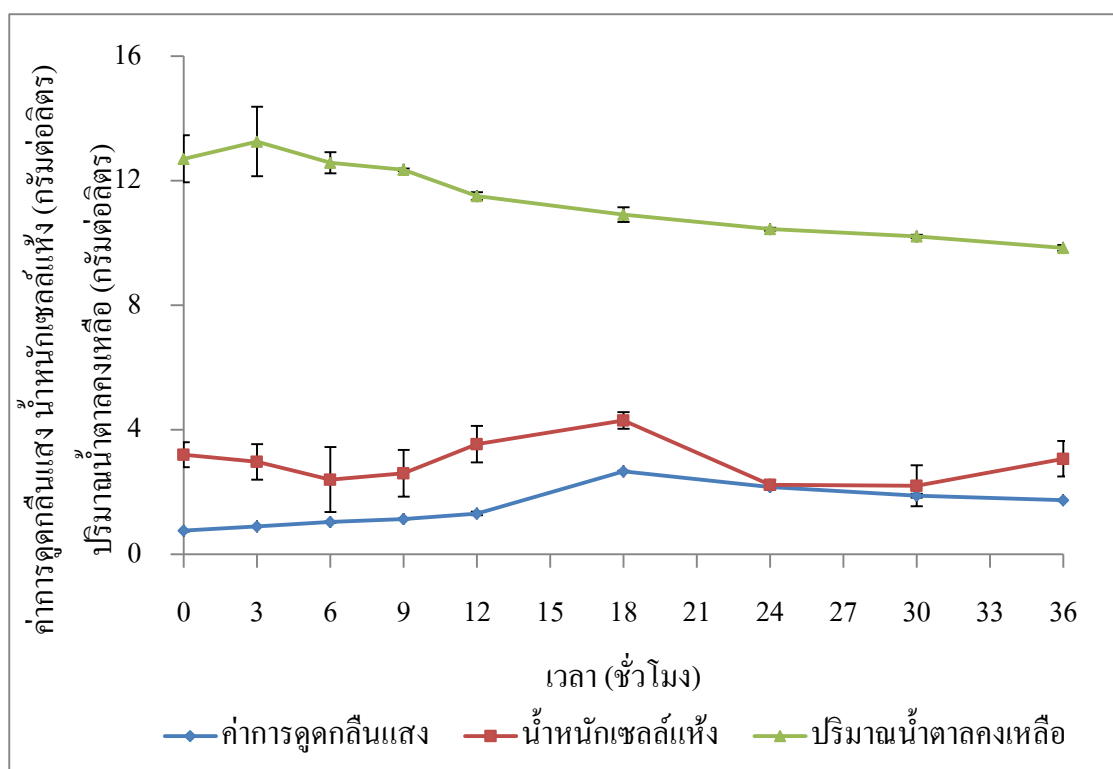


ภาพที่ 8 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM



ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร NB

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Schaeffer's ดังภาพที่ 10 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. มีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ใน 9 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญจะลดลงเข้าสู่ระยะ Stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.16 และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.30 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสคงเหลือพบว่า ปริมาณกลูโคสลดลงจนถึงชั่วโมงสุดท้าย ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ 9.84 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 10 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร Schaeffer's

เมื่อเปรียบเทียบผลของการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของ *Bacillus* sp. ของอาหารสูตร BPM เทียบกับอาหารสูตร NB และอาหารสูตร Schaeffer's พบว่า มีแนวโน้มการเจริญเติบโตไปในทิศทางเดียวกัน โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM และ NB การเจริญจะเข้าสู่ระยะ log phase จากชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 9 โดยไม่ปรากฏระยะ lag phase หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะเริ่มลดลง และคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้าย แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาลักษณะการเจริญของเชื้อ

Bacillus sp. ในอาหารสูตร Schaeffer's มีแนวโน้มของระยะ lag phase ก่อนข้างนานโดยจะเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 9 ถึง 18 จากนั้นจึงลดลงจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยสูตรที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ได้แก่สูตร NB ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือสูตร BPM มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.77 กรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่ให้ผลการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ต่ำสุดคือสูตรอาหาร Schaeffer's ซึ่งให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.30 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของคุณภาพน้ำตาลในอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของสูตร NB มีค่าต่ำสุด ประมาณ 0 ถึง 1 กรัมต่อลิตรเท่านั้น และมีค่าคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อาหารสูตร BPM และ Schaeffer's มีแนวโน้มการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 18 ชั่วโมง แต่เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 36 และมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 7.62 กรัมต่อลิตร ซึ่งในอาหารสูตร Schaeffer's ยังคงมีปริมาณน้ำตาลคงเหลืออยู่เป็นปริมาณมากถึง 9.90 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 1 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ *Bacillus* sp. จากการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ในระดับพลาสติก

สูตรอาหาร	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_x (g/l/h)	r_s (g/l/h)
BPM	6.77 ± 0.85 ^b	0.12 ± 0.01 ^b	0.83 ± 0.11 ^b	0.75 ± 0.09 ^b	0.91 ± 0.01 ^a
NB	8.50 ± 0.79 ^a	0.25 ± 0.05 ^a	79.50 ± 27.0 ^a	0.94 ± 0.09 ^a	0.00 ± 0.01 ^c
Schaeffer's	4.30 ± 0.27 ^c	0.06 ± 0.04 ^a	1.02 ± 0.05 ^b	0.24 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.01 ^b

หมายเหตุ x คือ ปริมาณมวลเซลล์ จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

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

r_x คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

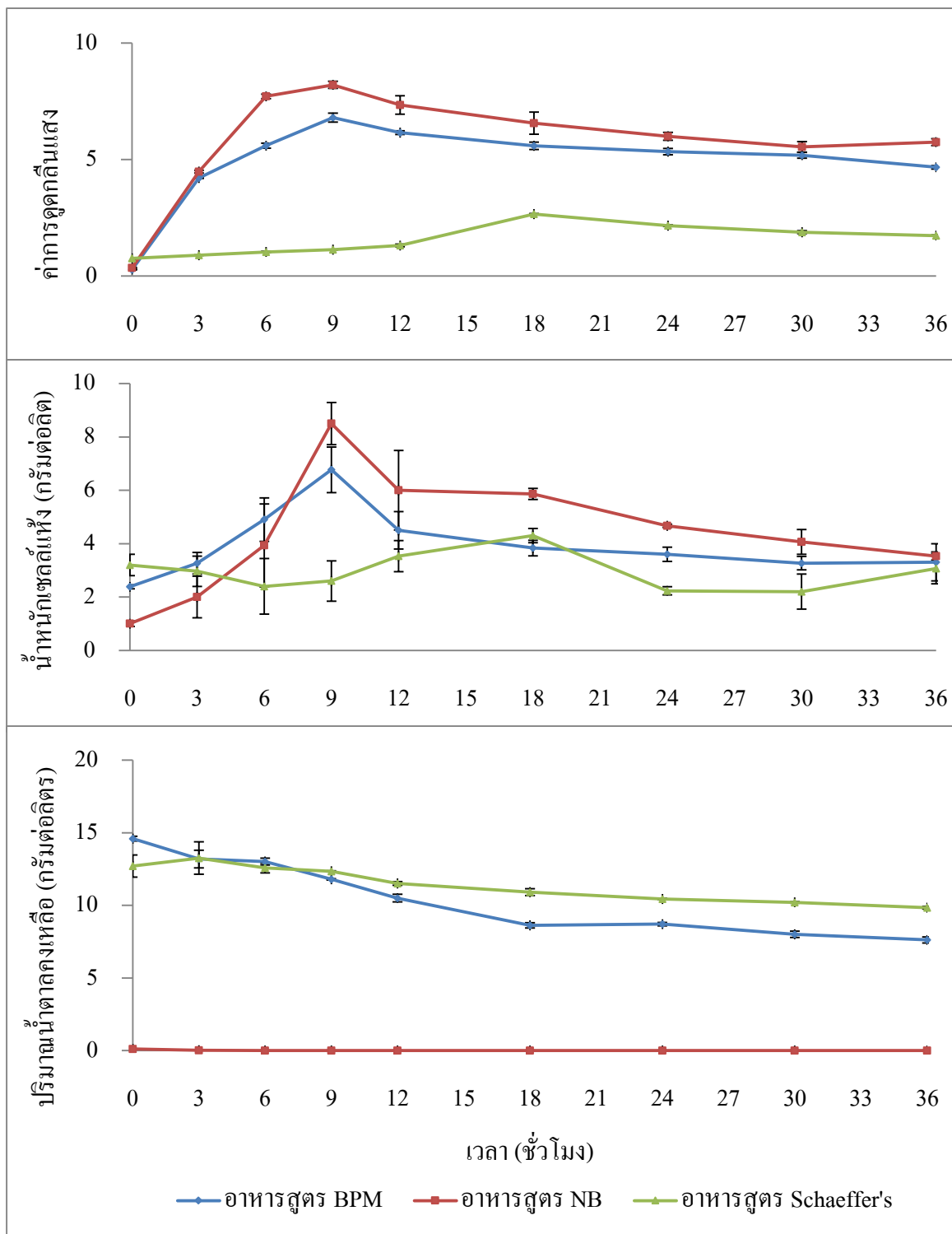
r_s คือ อัตราการใช้สับสเตรท (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

เมื่อกำหนดค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ตามตารางที่ 1 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM พบว่า มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 6.77 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญ

จำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จุลินทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.83 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.91 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร NB พบว่า มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จุลินทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 79.50 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร Schaeffer's พบว่า มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 4.30 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.06 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จุลินทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 1.02 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. แล้วจะพบว่า อาหารสูตร NB จะให้ค่ามากที่สุด รองลงมาคืออาหารสูตร BPM และอันดับสุดท้ายจะเป็นอาหารสูตร Schaeffer's

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในภาพที่ 8 ถึง 11 จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารการเพาะเลี้ยงสูตร BPM มีประสิทธิภาพสูงกว่าอาหารสูตร Schaeffer's แต่เมื่อเทียบอาหารสูตร BPM กับอาหารสูตร NB พบว่าอาหารสูตร NB มีการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ดีกว่าอาหารสูตร BPM แต่เนื่องจากการทดลองเพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง ประเภทอาหารที่เหมาะสมแก่การนำไปใช้ในการทดลองต่อไปจะต้องเป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบและปริมาณที่แน่นอน ดังนั้นอาหารสูตร BPM จึงเป็นอาหารสูตรที่จะนำไปใช้ในการทดลองเพื่อปรับปรุงเพื่อผลิตเซลล์ *Bacillus* sp. ความเข้มข้นสูง



ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ สูตร BPM, NB และ Schaeffer's

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ในระดับฟลาस्क

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของอาหารสูตร BPM สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Bacillus* sp. ให้ได้ความเข้มข้นสูง จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ได้แก่ กลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้อาหารสูตร BPM ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ในบัพเฟิลฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณการเพาะเลี้ยง 150 มิลลิลิตร กล้าเชื้อเริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 5 ของปริมาณอาหาร ค่า pH เท่ากับ 6.5 บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

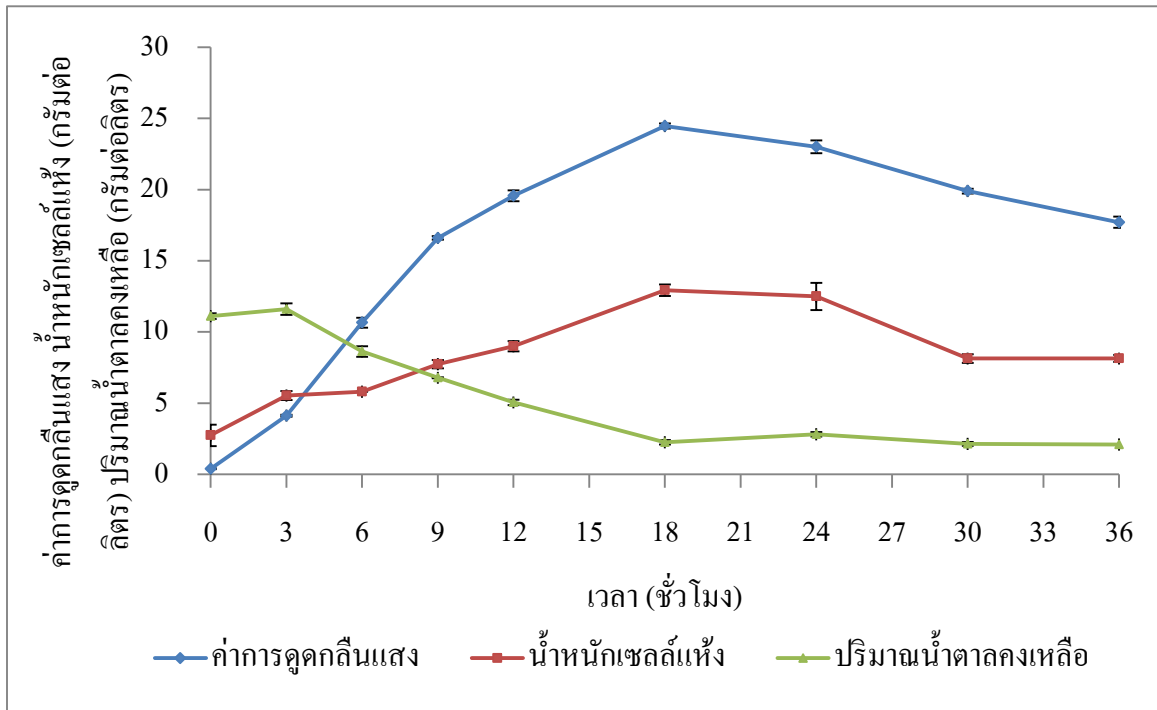
เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งของคาร์บอน (ภาพที่ 12) พบว่ามีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 18 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 18 จะเริ่มมีการเข้าสู่ระยะ stationary phase และอัตราการเจริญเติบโตลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.93 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 24.47 และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไปพบว่าช่วง 0 ถึง 18 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีแนวโน้มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 2.09 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งของคาร์บอน ได้ผลดังภาพที่ 13 พบว่า มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 9 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 9 จะเริ่มมีการเข้าสู่ระยะ stationary phase จนกระทั่งชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 8.10 และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไปพบว่าช่วง 0 ถึง 18 ชั่วโมงแรกปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีแนวโน้มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.05 กรัมต่อลิตร

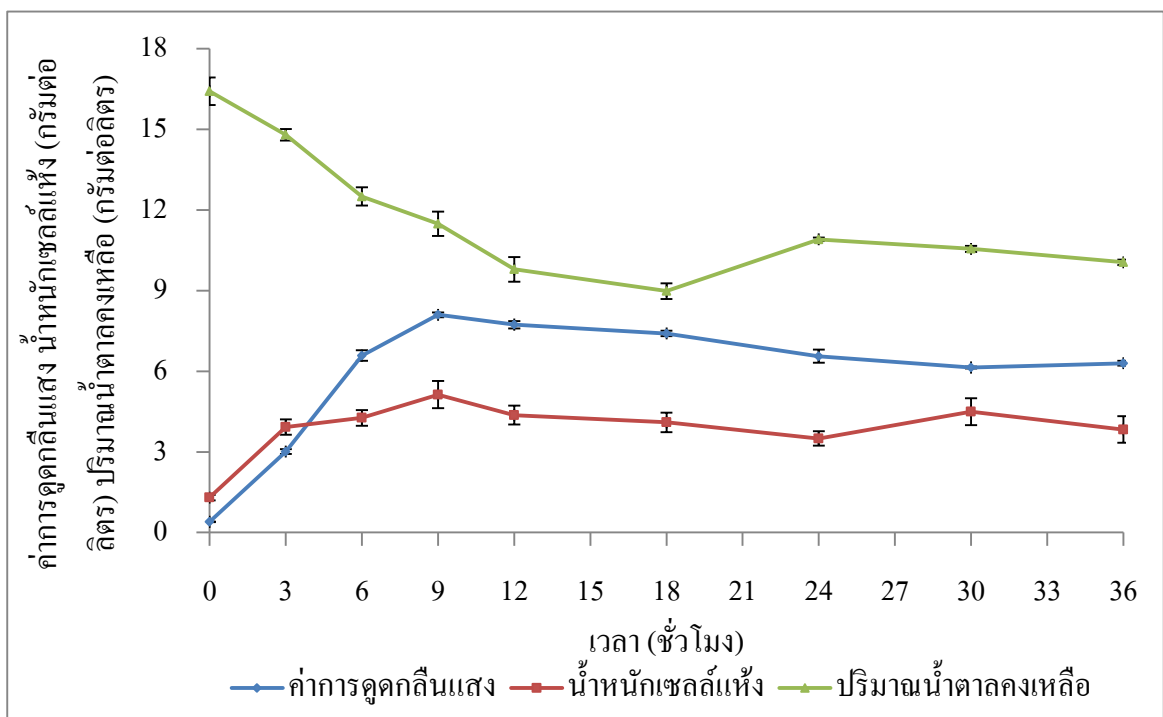


2820514691

BUU_1Thesis_59910006_thesis / rev: 01082563_15:02:13 / seq: 35



ภาพที่ 12 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีเคกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน



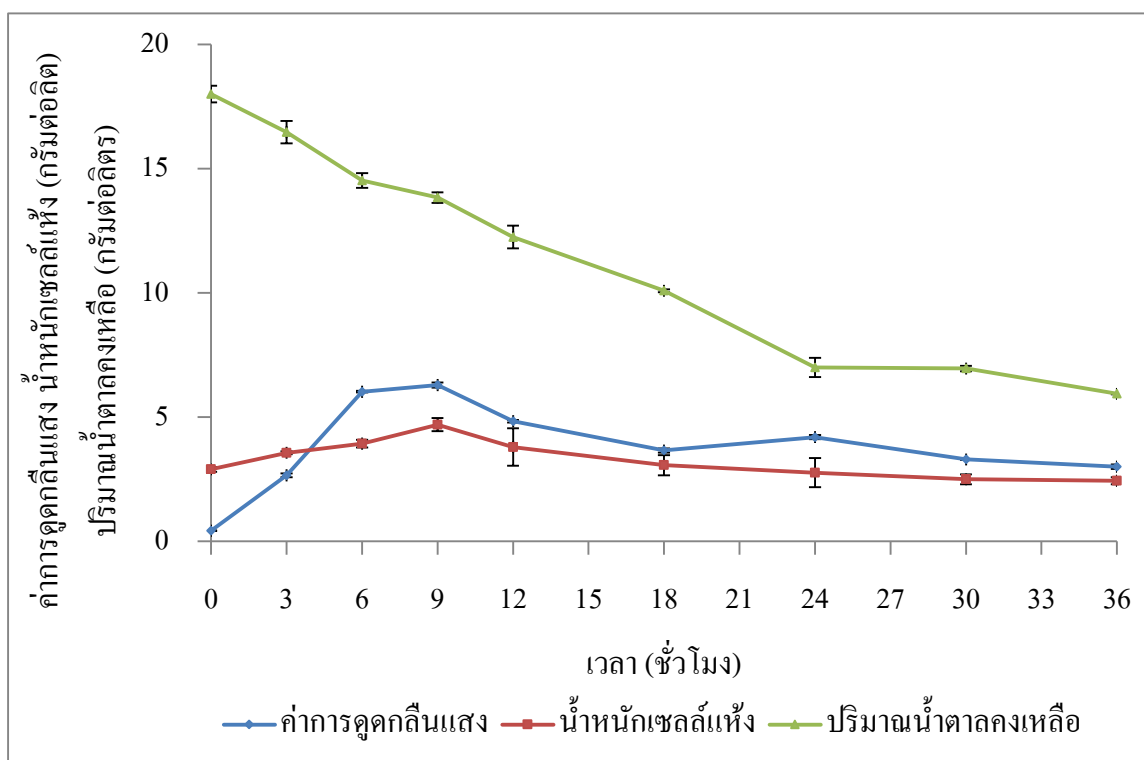
ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีกลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน



2820514691

BUU_1Thesis 59910006 thesis / rev: 01082563 15:02:13 / seq: 35

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งของคาร์บอน ได้ผลดังภาพที่ 14 พบว่ามีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 9 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 9 จะเริ่มมีการเข้าสู่ระยะ stationary phase และอัตราการเจริญจะลดลงจนกระทั่งชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.70 กรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 6.29 และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าช่วง 0 ถึง 18 ชั่วโมงแรกปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นสูงขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 24 และมีแนวโน้มลดลงจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 14 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน



2820514691

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เทียบกับกลูโคสทางการค้า และกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ภาพที่ 12 ถึง 15) พบว่า แนวโน้มของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. จากการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีแนวโน้มเจริญไปในทิศทางเดียวกัน คือ การเจริญเติบโตเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 9 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงและคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำตาลกลูโคสทางการค้ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดจากการใช้กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 4.70 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่างจากการใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งของคาร์บอนซึ่งมีการเจริญซ้ากว่าแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดที่กล่าวมาข้างต้น แต่ถึงแม้ว่าจะมีการเจริญซ้ากว่าแต่ปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้เดกซ์ตรินนั้นกลับให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 12.93 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงจากแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งพบว่า ปริมาณน้ำตาลคงเหลือของการเพาะเลี้ยงจากการใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 10.05 และ 5.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณน้ำตาลคงเหลือจากการใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 2.09 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับอาหารสูตร BPM มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงสังเกตได้จากปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำตาลคงเหลือของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 2 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ *Bacillus* sp. จากการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในระดับพลาสติก

แหล่งคาร์บอน	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_x (g/l/h)	r_s (g/l/h)
กลูโคสทางการค้า	5.13 ± 0.50 ^b	0.15 ± 0.02 ^a	0.45 ± 0.05 ^b	0.57 ± 0.06 ^b	0.94 ± 0.05 ^a
กลูโคสจากการย่อยแป้ง	4.70 ± 0.27 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.05 ^a	0.52 ± 0.03 ^b	0.68 ± 0.02 ^b
เดกซ์ตริน	12.93 ± 0.40 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.04 ^{ab}	0.72 ± 0.03 ^a	0.99 ± 0.00 ^a

หมายเหตุ x คือ ปริมาณมวลเซลล์ จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

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

r_x คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

r_s คือ อัตราการใช้สับสเตรท (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

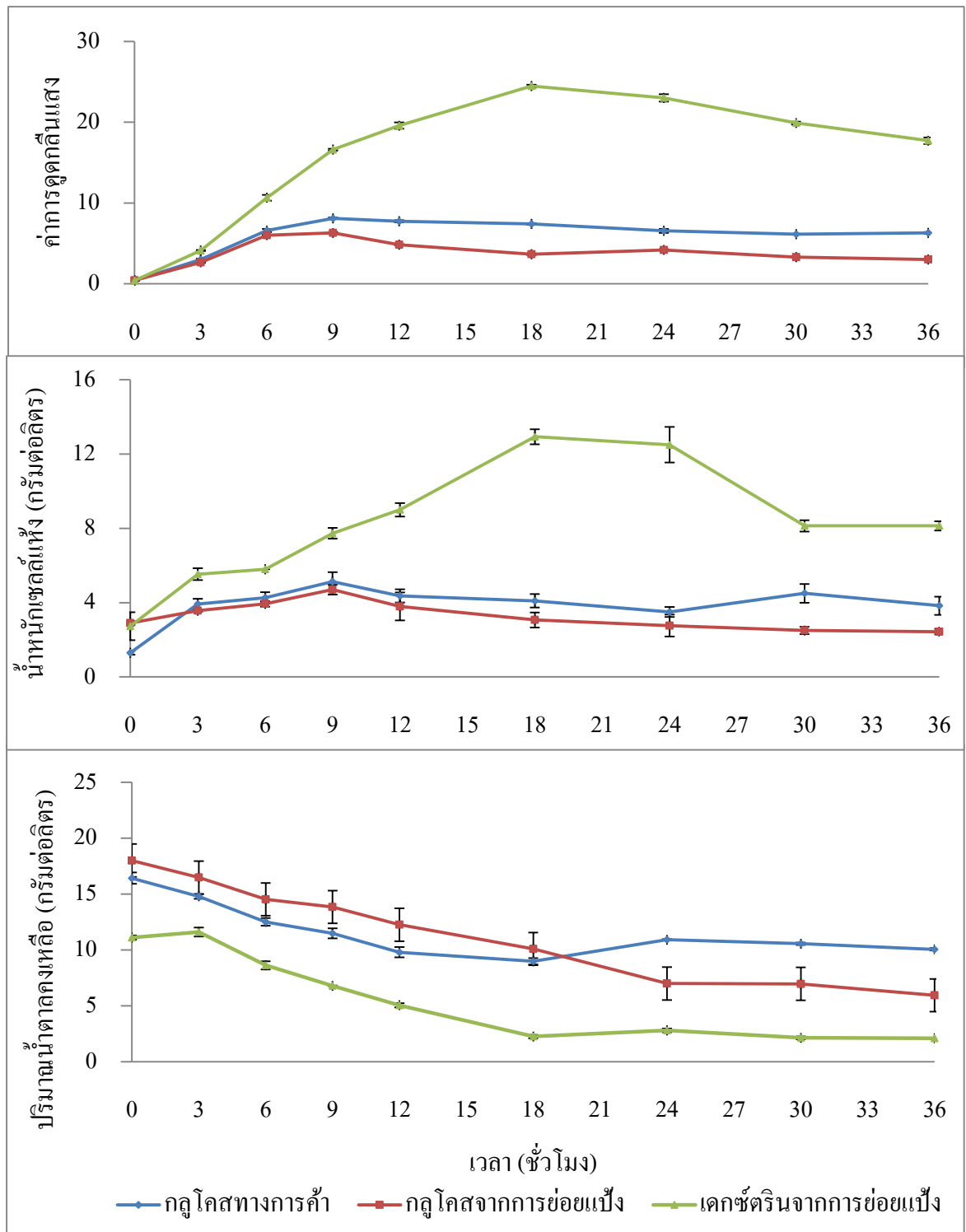
เมื่อกำหนดค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่ใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ตามตารางที่ 2 พบว่ามีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 12.93 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.18 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จุนทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่ใช้กลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 5.13 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.15 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จุนทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่ใช้กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 4.70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.05 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จุนทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ

0.29 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้
สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การ
เจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. แล้วจะพบว่า อาหารสูตร BPM ที่ใช้เคกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมัน
สำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่ามากที่สุด รองลงมาคือใช้กลูโคสทางการค้า และอันดับสุดท้ายเป็น
กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง



2820514691



ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 แหล่ง ได้แก่ กลูโคสทางการค้า, กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และ เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

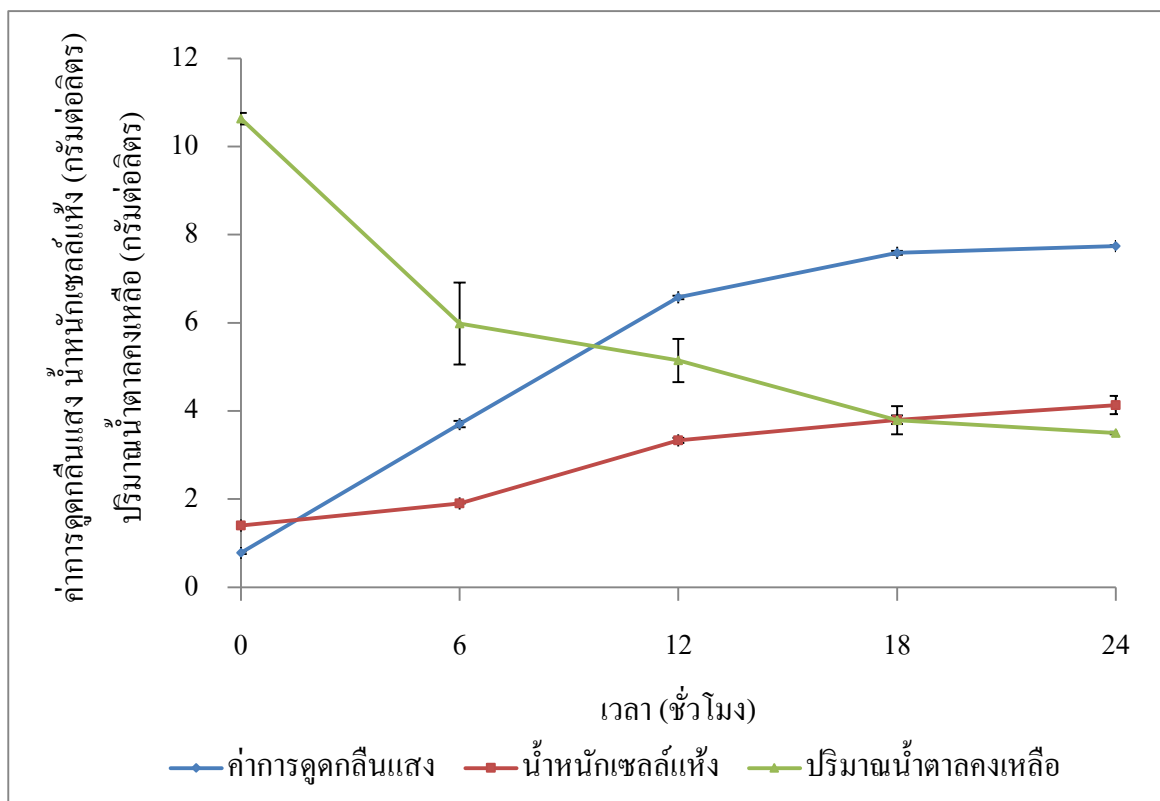
4.3 ผลการศึกษาการใช้เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในระดับฟลาสก์ พบว่า เดกซ์ตรินมีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง จึงได้มีการนำ เดกซ์ตรินมาทำการศึกษาต่อ โดยการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้ไม่สามารถทำการทดลองได้ในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ เนื่องจากการเจริญของเชื้อในอาหารความเข้มข้นสูงจะถูกจำกัดโดยปริมาณของอากาศภายใน ฟลาสก์ ทำให้ผลที่ได้ไม่เป็นไปตามลักษณะการเจริญของเชื้ออย่างแท้จริง จึงต้องขยายขนาดการเพาะเลี้ยงโดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร

การศึกษากการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ของเชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารสูตร BPM เปรียบเทียบการใช้เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการทำงานทั้งหมด (working volume) 3 ลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ของ ปริมาตรการเพาะเลี้ยงทั้งหมด ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 6.5 อัตราการเติมออกซิเจนแปรผันตามความเข้มข้นของเดกซ์ตริน เท่ากับ 1, 2 และ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ตามลำดับ อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500 ถึง 700 รอบต่อนาที ซึ่งมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

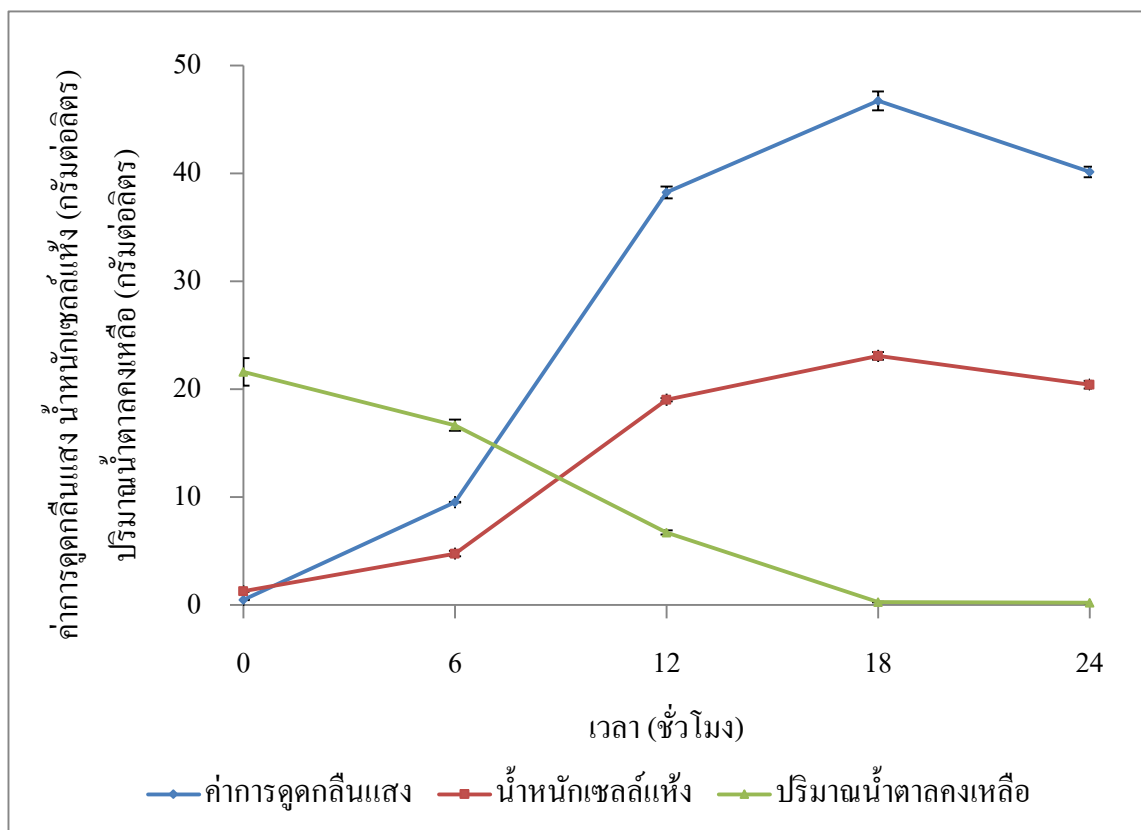
เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้ เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ภาพที่ 16 อัตราการเติม อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสมเท่ากับ 500 รอบต่อนาที พบว่า การเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในช่วง 24 ชั่วโมง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.13 กรัมต่อลิตร โดยที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 7.74 และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสพบว่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 จนถึง สิ้นสุดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงคือ 24 ชั่วโมง มีปริมาณกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 3.50 กรัมต่อลิตร





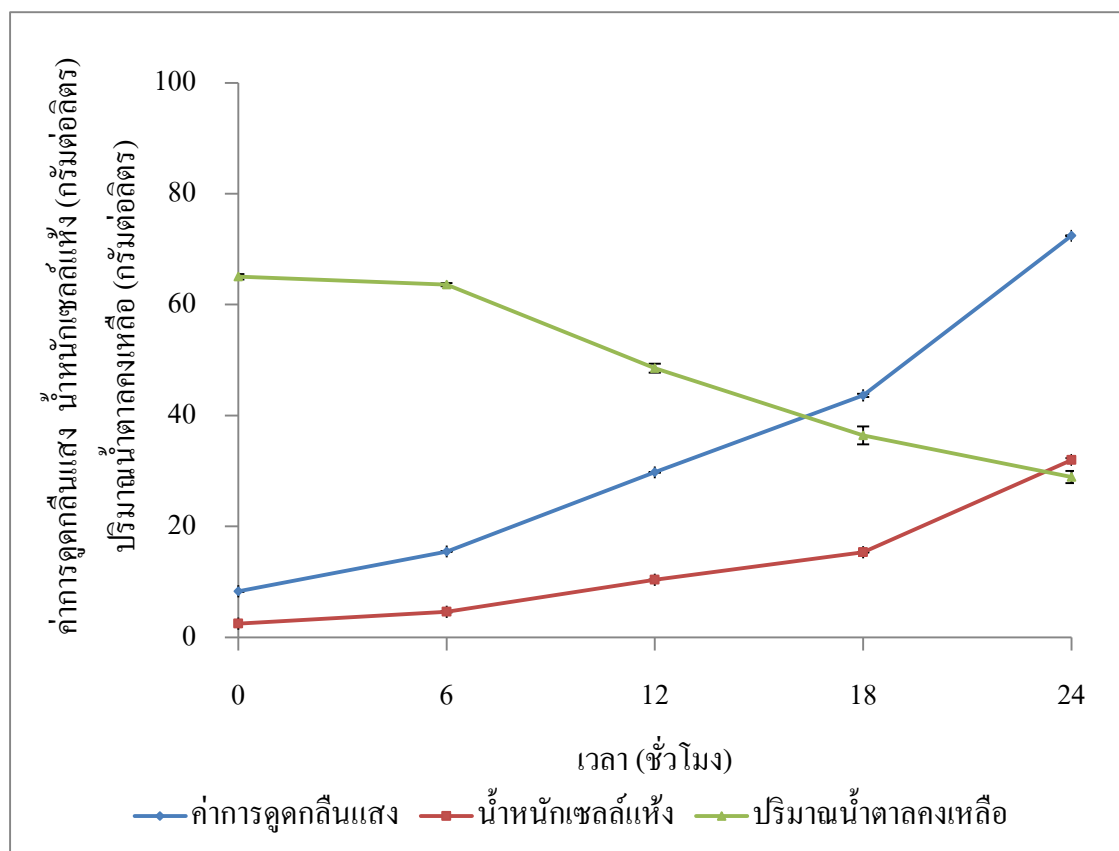
ภาพที่ 16 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ภาพที่ 17 อัตราการเติมอากาศที่ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสมเท่ากับ 600 รอบต่อนาที พบว่า การเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 18 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 23.10 กรัมต่อลิตร โดยที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 46.75 และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสพบว่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 จนถึงชั่วโมงที่ 18 และคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีปริมาณกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 17 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยใช้ เดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ภาพที่ 18 อัตราการเติม อากาศที่ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวนผสมเท่ากับ 700 รอบต่อนาที พบว่า การเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีค่าน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 31.98 กรัมต่อลิตร โดยที่มีค่าการดูคกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 72.42 และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสพบว่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 จนถึง ชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงคือที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 28.91 กรัมต่อ ลิตร



ภาพที่ 18 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ตรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญมากที่สุด โดยให้น้ำหนักรีดแห้งเท่ากับ 31.98 กรัมต่อลิตร ถัดมาเป็นการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ตรินความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรีดแห้งสูงสุดเท่ากับ 23.10 กรัมต่อลิตร และการเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำสุด มีค่าน้ำหนักรีดแห้งสูงสุดเท่ากับ 4.13 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของเดกซ์ตรินที่ 20 กรัมต่อลิตร และ 100 กรัมต่อลิตร มีช่วงของระยะ log phase ที่ยาวนานกว่าเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีระยะ log phase อยู่ในช่วง 0 ถึง 18 ชั่วโมง เนื่องจากความเหมาะสมของการปรับตัวเข้าสู่สภาวะการเพาะเลี้ยงใหม่ แต่เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งการเพาะเลี้ยงเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำที่ลดลงเหลือเท่ากับ 3.50, 0.20 และ 28.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

ตารางที่ 3 ค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ *Bacillus* sp. จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้เดกซ์ตรินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ในถังหมัก 5 ลิตร

ความเข้มข้น ของเดกซ์ตริน (กรัมต่อลิตร)	x (g/l)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_x (g/l/h)	r_s (g/l/h)
20	4.13 ± 0.21 ^c	0.04 ± 0.01 ^c	0.25 ± 0.01 ^c	0.17 ± 0.01 ^c	0.69 ± 0.00 ^c
40	23.10 ± 0.36 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	0.58 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.02 ^b	2.21 ± 0.00 ^b
100	31.98 ± 0.34 ^a	0.19 ± 0.00 ^a	0.45 ± 0.01 ^b	1.33 ± 0.02 ^a	2.96 ± 0.04 ^a

หมายเหตุ x คือ ปริมาณมวลเซลล์ จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

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

r_x คือ อัตราการสร้างมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

r_s คือ อัตราการใช้สับสเตรท (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

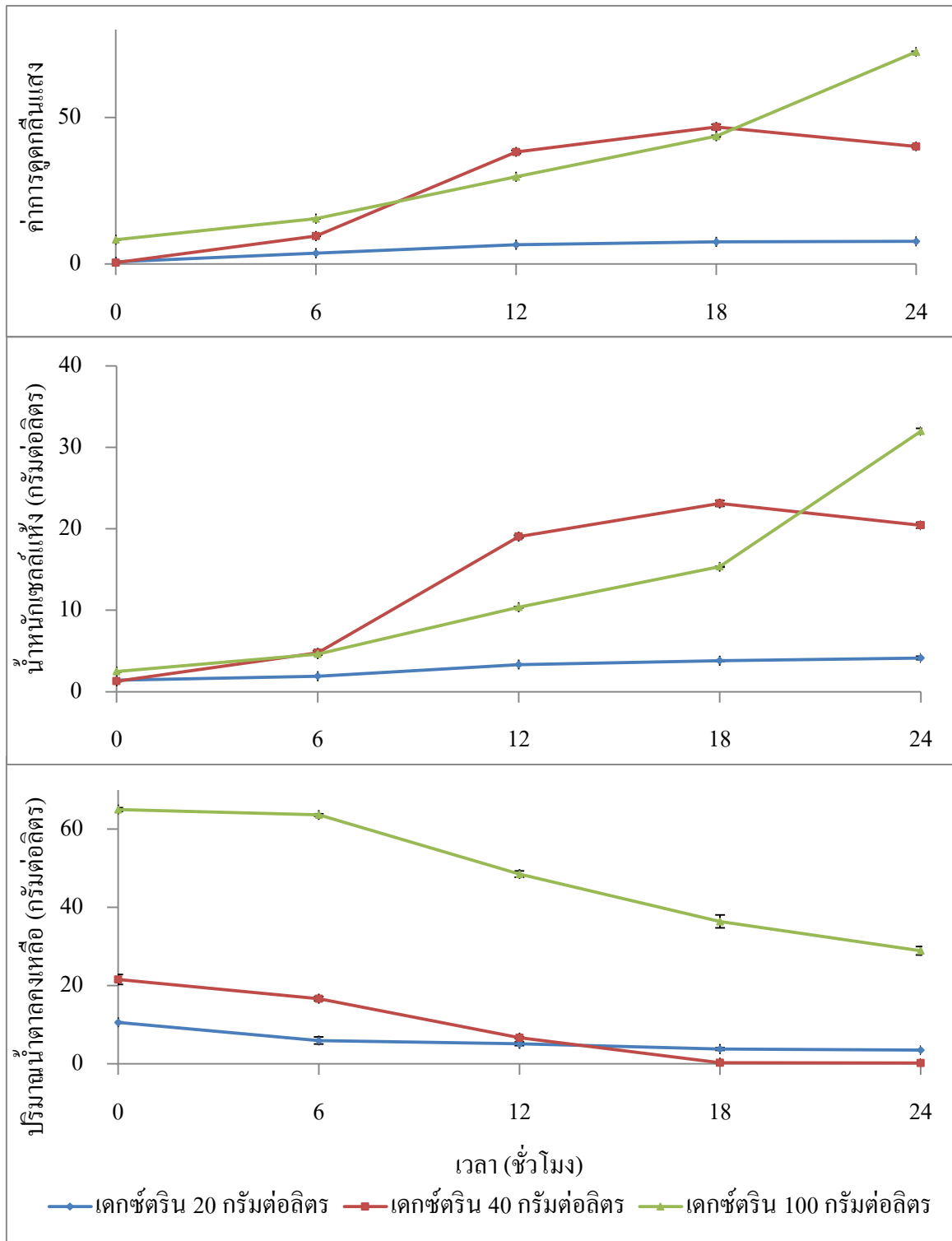
เมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่มีเดกซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยเดกซ์ตรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ให้ผลการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ดีที่สุด มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 31.98 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.19 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จลินทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 2.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BPM ที่ใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญดีรองลงมา พบว่ามีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 23.10 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จูลินทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 2.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ด้วยอาหารสูตร BPM ที่ใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 4.13 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.04 ต่อชั่วโมง ผลผลิตของมวลเซลล์จูลินทรีย์จากมวลสับสเตรท ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.25 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 0.69 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



2820514691

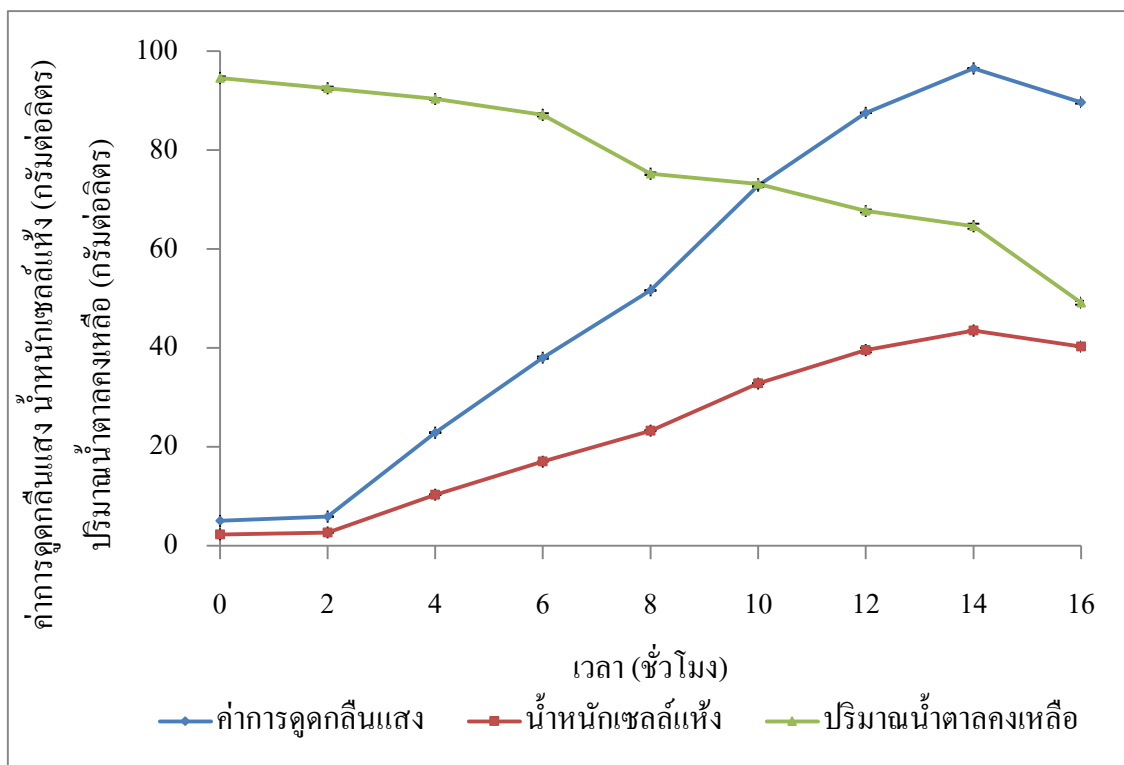


ภาพที่ 19 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร

4.4 ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบกะที่ระดับถังหมัก 30 ลิตร

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. เพื่อผลิตเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูงซึ่งจากการทดลองใช้ เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้นสูงพบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* sp. ให้มีความเข้มข้นสูง ในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นจึงได้นำมาขยายขนาดการเพาะเลี้ยง ในถังหมักขนาด 30 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองมีปริมาตรทำงานรวม 15 ลิตร อุณหภูมิการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ความเร็วของใบพัดในการกวนผสมใน 6 ชั่วโมง แรกเท่ากับ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นจะปรับเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยมี เดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 20) พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 14 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการเจริญจะลดลง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 16 มีค่าน้ำหนัก เซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 43.45 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 89.50 เมื่อพิจารณาการ เปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล พบว่า มีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 16 ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุด การเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 49.13 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 20 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 30 ลิตร

เมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่า มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 43.49 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.21 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อสับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.85 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 3.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

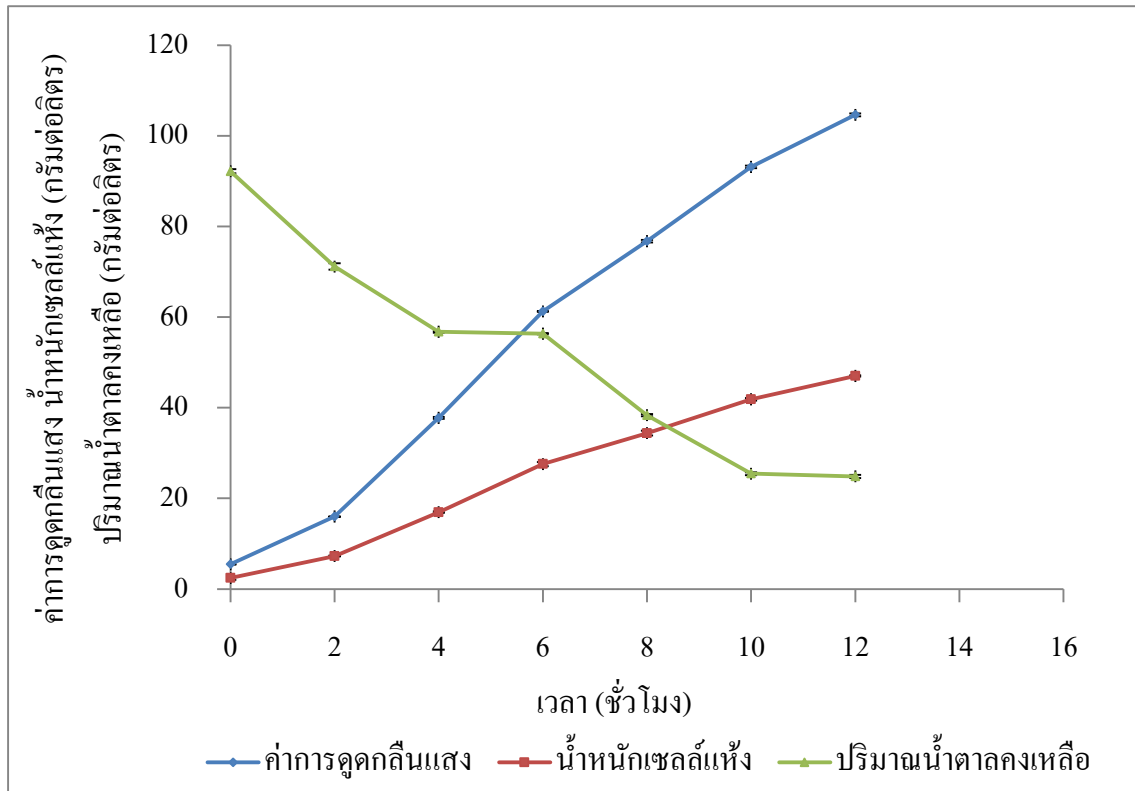
4.5 ผลการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบกะที่ระดับถังหมัก 300 ลิตร

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. เพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงซึ่งจากการทดลองใช้เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นสูงพบว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* sp. ให้ได้ความเข้มข้นสูง ในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร จากนั้นจึงได้นำมาขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร เพื่อเป็นต้นแบบการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการ

ทดลองมีปริมาตรทำงานรวม 15 ลิตร อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ความเร็วของใบพัดในการกวนผสมใน 6 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 100 รอบต่อนาที หลังจากนั้นปรับเป็น 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM โดยมีเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 21) พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการเจริญจะลดลง จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 12 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 47.03 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 104.65 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่า มีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 12 ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 24.87 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร พบว่า มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 47.03 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อสับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.63 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้สับสเตรท (r_s) เท่ากับ 6.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



ภาพที่ 21 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 300 ลิตร

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารสูตร BPM ต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp.

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง รวมถึงการสร้างผลผลิตต่าง ๆ ซึ่งโดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบ่งตามส่วนผสมหรือองค์ประกอบของสารอาหารแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีแน่นอนทั้งชนิดและปริมาณ (Complex media หรือ Non-synthetic medium) อาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะมีสารอินทรีย์มากมายที่ได้จากเนื้อเยื่อพืช หรือสัตว์ เช่น เปปโตน (peptone), สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract), สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) เป็นต้น ประเภทที่ 2 เป็นอาหารสังเคราะห์ (Synthetic media หรือ Chemically defined media) เป็นอาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน ซึ่งในการเตรียมอาหารแต่ละครั้งจะได้อาหารที่มีองค์ประกอบเหมือนเดิมทุกครั้ง และประเภทที่ 3 ได้แก่ อาหารกึ่งสังเคราะห์ (Semi-define medium) สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงจะนิยมใช้อาหารประเภทสังเคราะห์ (Shojaosadat et al., 2008) โดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมอาหารประเภทสังเคราะห์จะเป็นที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบราคาถูก ประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ สามารถควบคุมคุณภาพของกระบวนการให้คงที่ และเป็นไปตามเป้าหมายที่กำหนดไว้

อาหารสูตร NB นั้นทำให้ผลการเจริญค่อนข้างดีเนื่องจากคุณค่าทางอาหารเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ภายในอาหารสูตรนี้ไม่มีองค์ประกอบของน้ำตาล ทำให้ค่าผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปนั้นสูงผิดปกติ ซึ่งสังเกตได้จากค่าอัตราการใช้น้ำตาลของอาหารสูตร NB ที่มีค่าประมาณ 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หมายถึงว่าไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบแต่ที่เชื้อเจริญได้เนื่องจากมีสารอาหารอย่างอื่นทดแทน ทั้งจากเนื้อสกัด (beef extract) และเปปโตน ที่เป็นแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจนและวิตามินต่าง ๆ เป็นต้น ทำให้อาหาร NB เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทุกชนิด แต่เนื่องจากอาหารสูตร NB เป็นอาหารประเภท complex medium เป็นอาหารที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน รวมทั้งมีราคาแพงจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสูง เพราะอาหารที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูงจะต้องเป็นอาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอนทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งเมื่อศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหาร BPM ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้

ความเข้มข้นสูงนั้นเทียบกับอาหารสูตร NB และอาหารสูตร Schaeffer's (Schaeffer et al., 1965) ที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบว่า การเพาะเลี้ยงโดยใช้สูตร BPM มีประสิทธิภาพน้อยกว่าอาหารสูตร NB คือมีปริมาณมวลเซลล์จากการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าอาหารสูตร NB ซึ่งเป็นอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งอาหารสูตร BPM มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 6.77 กรัมต่อลิตร มวลเซลล์ของอาหารสูตร NB เท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) จากอาหารสูตร BPM เท่ากับ 0.12 และอาหารสูตร NB เท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) ของอาหาร BPM เท่ากับ 0.83 และอาหาร NB เท่ากับ 79.50 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) ของอาหาร BPM เท่ากับ 0.75 และ NB เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการใช้น้ำตาล (r_s) ของอาหาร BPM เท่ากับ 0.91 และอาหาร NB เท่ากับ 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 1) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแล้วอาหารสูตร BPM นั้นให้ผลการเจริญดีใกล้เคียงกับอาหาร NB ซึ่งมีรายงานการนำอาหารสูตร BPM ไปใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* นอกจากนี้ยังสามารถนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งให้ผลที่มีประสิทธิภาพต่อการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างดี (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556) นอกจากนี้ยังมีการนำอาหารสูตร BPM มาทำการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus cohnii* ที่คัดแยกมาจากดิน ซึ่งผลที่ได้คืออาหารสูตรนี้มีประสิทธิภาพส่งเสริมให้มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.124 ต่อชั่วโมง อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ (Y_p) เท่ากับ 1.785 U/g.cell.h และให้อัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.396 U/ml/h (กัญญาวีร์ คูคำ, 2561)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ในการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPM และ Schaeffer's พบว่า อาหารสูตร BPM มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สูงกว่าอาหารสูตร Schaeffer's เมื่อพิจารณามวลเซลล์ (x) อาหารสูตร BPM เท่ากับ 6.77 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตร Schaeffer's เท่ากับ 4.30 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญแล้ว พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของอาหารสูตร BPM เท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง อาหารสูตร Schaeffer's เท่ากับ 0.06 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.83 และ 1.02 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.75 และ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.91 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าต่าง ๆ เหล่านี้แล้วอาหารที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงแล้วจะได้ว่าอาหารสูตร BPM เป็นอาหารที่เหมาะสมกว่าอาหารสูตร Schaeffer's นอกจากจะให้ค่าสูงกว่าแล้วยังพบว่าองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เป็นธาตุอาหารหลักมีเหมือนกัน แต่ที่ต่างกันคือในสูตรอาหาร BPM จะมีธาตุอาหารเสริม

ค่อนข้างหลายชนิดซึ่งใส่ในปริมาณที่น้อยแต่ส่งผลให้การเจริญ *Bacillus* sp. มีประสิทธิภาพดีกว่าอาหารสูตร Schaeffer's และด้วยอาหารสูตร BPM เป็นอาหารประเภทสังเคราะห์ที่มีข้อดีคือสารอาหารราคาถูก มีปริมาณของสารอาหารที่แน่นอน สามารถนำไปปรับปรุงเพื่อเพิ่มการผลิตหรือเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด จึงเลือกอาหาร BPM มาใช้ในการผลิตเซลล์ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูง

การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสูตร BPM ต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp.

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตมวลเซลล์ของจุลินทรีย์ คือ องค์ประกอบของสารอาหารเพาะเลี้ยง แหล่งคาร์บอน แหล่งของไนโตรเจน และสถานะของการเจริญเติบโต เช่นความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved O₂ concentration) ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การกวนผสม และแรงเฉือนใบพัด โดยเฉพาะแหล่งของคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนจึงมีความสำคัญที่ส่งเสริมการเจริญและผลผลิตให้ประสบความสำเร็จตามเป้าหมาย แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ทั่วไปมักจะใช้น้ำตาลกลูโคส แต่เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสทางการค้ามีราคาแพง และปัญหาการคั่งของกลูโคส (Crab-tree effect) ซึ่งจะส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยการยับยั้งการเจริญด้วย ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและคิดค้นหาแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติมาใช้ทดแทน แหล่งคาร์บอนจากวัสดุทางธรรมชาติเป็นที่นิยมมากที่สุดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิตทางชีวภาพ คือ แป้งต่าง ๆ เช่น แป้งสาลี แป้งมัน แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งแป้งเหล่านี้จะถูกใช้ในรูปแบบที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจางและเอนไซม์เพื่อให้ได้กลูโคสที่หลากหลาย แต่การที่ไฮโดรไลซ์ด้วยกรดอาจได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษซึ่งอาจไม่เหมาะสมสำหรับบางกระบวนการที่จำเพาะ (สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร, 2559) จึงนิยมใช้เอนไซม์ย่อยแทนกรด ปัจจุบันน้ำตาลที่มาจาก การย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ เดกซ์ทริน ซึ่งเดกซ์ทรินเป็น โอลิโกเมอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยจำนวนที่ไม่แน่นอนในแต่ละสาย ซึ่งเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังจะย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส และจะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ซึ่งจากรายงานการใช้เดกซ์ทรินเทียบกับการใช้กลูโคสจากการค้าในการเพาะเลี้ยง *E. coli* พบว่าเดกซ์ทรินมีประสิทธิภาพดีกว่ากลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเดกซ์ทรินจะค่อย ๆ ถูกย่อยให้เป็นกลูโคสจึงลดปัญหาการคั่งของกลูโคสทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ตลอด (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

แหล่งคาร์บอนที่ *Bacillus* sp. สามารถใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มีหลายชนิด ซึ่งมีรายงานดังต่อไปนี้ น้ำตาลกลูโคส (Tian et al., 2016) Cellulose (Zhang, Sathitsuksanoh, Zhu & Percival Zhang, 2011) แป้ง (starch), ไกลโคเจน (glycogen), cellobiose, maltohexaose-maltopeptase, maltotriose และ maltotriose อะราบินโนส (arabinose), ไซโลส (xylose), แรมโนส (rhamnose), ฟรักโทส (fructose), แมนโนส (mannose), ซอโบส (sorbose), ซูโครส (sucrose), ทรีฮาโลส (trehalose), แลคโตส (lactose), มอลโตส (maltose), แรมฟีโนส (raffinose), อินอซิทอล (inositol), อินนูลิน (inulin) (Bezbaruah, Gogoi & Pillai, 1994) ซานอ้อยไฮโดรไลเซท (sugarcane bagasse), หญ้าไฮโดรไลเซท (Bocchini, Oliveira, Gomes & Silva, 2005) เปลือกกุ้ง เปลือกปู (Chang, Chen & Wang, 2003) เปลือกหอย (Chang et al., 2009) และ แลคซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (กัญญาวีร์ คูคำ, 2561)

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแลคซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังกับกลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเซลล์ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นสูง พบว่า การใช้แลคซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้แหล่งของคาร์บอนจากกลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 12.93, 5.13 และ 4.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าตัวแปรจลนพลศาสตร์การเจริญอื่น ๆ พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.18, 0.15 และ 0.05 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.57, 0.45 และ 0.29 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.72, 0.57 และ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.99, 0.94 และ 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 2) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์การเจริญเหล่านี้ ก็จะทำให้เห็นว่าแลคซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อผลิตเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูงมากกว่าการใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Bacillus sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีแลคซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างชัดเจน แตกต่างจากการใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ขวัญฤทัย มาลัยเรือง (2556) ที่มีการนำแลคซ์ตรินที่มาจากแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* เพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงและให้ผลได้เซลล์สูงอย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับ กัญญาวีร์ คูคำ (2561) ที่ใช้แลคซ์ตรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังในการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* ในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งให้ผลดี การที่เชื้อสามารถใช้แลคซ์ตรินได้ดีนั้นเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียสกุล

Bacillus นั้นเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์และใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ อาทิเช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทั้งชนิด แอลฟาและเบต้า จาก *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. vulgatus*, *B. gavageus*, *B. polymyxa*, *B. mycoides*, *B. aterimus*, *B. megaterium* และ *B. licheniformis* (Babu & Satyanarayana, 1995; Raul, Biswas, Mukhopadhyay, Kumar Das, & Gupta, 2014) เอนไซม์โปรติเอส (Protease) และเอนไซม์ไลเปส (Lipase) จาก *B. subtilis* (Barros, Simiqueli, de Andrade, & Pastore, 2013) เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) จาก thermophilic *Bacillus* sp. (Gill & Kaur, 2004) นอกจากนั้นยังพบรายงานการผลิตเอนไซม์พุลูลานเนส (Pullulanase) จาก thermophilic *Bacillus* sp. AN-7 (Kunammeni & Singh, 2006) ซึ่งถือว่ามีค่าสำคัญมากเมื่อวิเคราะห์ถึงกระบวนการการย่อยแป้งมันสำปะหลังแล้วจะพบว่าต้องใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยในรอบแรกจะได้เป็นเดกซ์ทรินซึ่งจะมีค่า DE หรือค่าสมมูลเดกซ์โทรส มีค่าอยู่ระหว่าง 5 – 20 จากนั้นจะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจึงได้เป็นกลูโคส ในบางครั้งในกระบวนการนี้อาจจะใช้เบต้าอะไมเลสหรือพุลูลานเนสร่วมด้วยเนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะช่วยตัดพันธะกิ่งของเดกซ์ทรินในส้นลงให้เป็นกลูโคสได้เช่นกัน ด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนจึงมีประสิทธิภาพดีกว่า แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น

การศึกษาการใช้เดกซ์ทรินที่มีความเข้มข้นสูงในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาการใช้เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงสูง ซึ่งการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงนั้น ตามหลักการการผลิตนั้นจะต้องใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงเช่นเดียวกัน ดังแสดงจากสมการ (Stanbury, Whitaker & Hall, 1995) ดังนี้

$$\text{C-source} + \text{N-source} + \text{O}_2 + \text{other requirement} \rightarrow \text{biomass} + \text{Products} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Heat}$$

ซึ่งเมื่อพิจารณาจากสมการ พบว่าปัจจัยที่สำคัญของการผลิตมวลเซลล์มาจากแหล่งคาร์บอนเป็นหลัก เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลจุลินทรีย์ต่าง ๆ และ *Bacillus* sp. จากการเพาะเลี้ยงพบว่าประกอบด้วยคาร์บอนมากที่สุดประมาณร้อยละ 50 ถึง 70 ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Bunch, 1994) แต่ปัญหาของการผลิตมวลเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงคือ จุลินทรีย์มีข้อจำกัดของการใช้คาร์บอน เช่น การเพาะเลี้ยง *E. coli* ถึงแม้ว่าจะทำให้สภาวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมหรือเพียงพอเพียงใด *E. coli* ก็ไม่สามารถเจริญได้ในกลูโคสได้เพียงความ

เข้มข้นที่ 50 กรัมต่อลิตร หากสูงเกินจากนี้จะส่งผลทำให้เกิดการคั่งของกลูโคส และมีผลไปยังการเจริญเติบโต (Shiloach and Fass, 2005) ดังนั้นเมื่อมีข้อจำกัดของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจึงมีการทดลองหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณมวลเซลล์ให้สูงขึ้น

แหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุด จากการเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ คือ เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดย *Bacillus* sp. สามารถจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนได้มากที่สุดถึง 100 กรัมต่อลิตร และให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งพิจารณาได้จากค่ามวลเซลล์ที่ได้และค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญอื่น ๆ ซึ่งที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 100 กรัมต่อลิตร มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 4.13, 23.10 และ 31.98 กรัมต่อลิตร คิดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.04, 0.16 และ 0.19 ต่อชั่วโมง ค่าการสร้างมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.25, 0.58 และ 0.45 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 0.17, 1.29 และ 1.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 0.69, 2.21 และ 2.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาค่าดังกล่าวแล้วทำให้เห็นวาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 12 ชั่วโมงนั้นค่าของความเข้มข้นที่ 40 กรัมต่อลิตร และ 100 กรัมต่อลิตรมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาค่าอัตราการใช้น้ำตาลและน้ำตาลคงเหลือของการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นที่ 100 กรัมต่อลิตร ก็พบว่าอัตราการใช้น้ำตาลสูงและเหลือน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นว่าเชื้อยังคงสามารถเจริญต่อได้อีก และยังมีค่ามวลเซลล์ที่สูงสุดด้วย เช่นเดียวกับการทดลองเพาะเลี้ยง *Kluyveromyces marxianus* SS106 ที่มีการใช้เดกซ์ทรินเพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนซึ่งให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงดีและมีปริมาณเซลล์ที่ให้ความเข้มข้นสูง (Malairuang, Krajang, Rotsattarat, Chamsart, 2020)

การที่ *Bacillus* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในเดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรได้เนื่องจากเดกซ์ทรินนั้นจะค่อย ๆ ถูกย่อยไปเป็นกลูโคส โมเลกุลเดียวได้จากเอนไซม์ชนิด อะไมเลส กลูโคอะไมเลส และพูลูลูนาสที่ถูกผลิตออกมาจากเซลล์ *Bacillus* sp. ตามระยะเวลาการเจริญของเชื้อ จากนั้นกลูโคสจะค่อย ๆ ถูกลำเลียงเข้าเซลล์ด้วยกระบวนการลำเลียงสารเข้าเซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มโปรตีนซึ่ง *Bacillus* sp. จะลำเลียงกลูโคสผ่านระบบ glucose-specific PTS permease (IIC-BA^{Glc}) และ hexose/H⁺ symporter (GlcP) (Jahreis, Pimentel-Schmitt, Bruckner & Titgemeyer, 2008) จากนั้นกลูโคสจะถูกนำไปใช้สร้างพลังงานในรูปแบบของ ATP อีกส่วนหนึ่งจะนำไปสังเคราะห์โปรตีน FtsZ หรือ Filamenting – temperature sensitive mutant Z ซึ่งเป็นโปรตีนเกี่ยวกับ

การแบ่งเซลล์ (Sekar et al., 2018) เพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ทำให้ไม่เกิดปรากฏการณ์การค้างของ
 กลูโคส

โดยทั่วไปเทคนิคที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียความเข้มข้นสูง ส่วนใหญ่นิยม
 ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ (fed-batch) เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นครั้ง
 คราวหรือต่อเนื่องโดยไม่มีการนำอาหารออกจนกว่าจะสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวเพียงครั้ง
 เดียว (วิเชียร กิจปรีชาวนิช, 2562) แต่เนื่องจากมีกระบวนการที่ซับซ้อน ยุ่งยาก และการคำนวณ
 อัตราการเจริญที่อาจจะไม่เหมาะสม ทำให้เกิดสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งอาหาร การเจือจางที่มาก
 จนเกินไป ระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ยาวนาน เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง และค่าใช้จ่ายของเครื่องมือที่
 เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มี
 การเติมเชื้อเริ่มต้น จากนั้นทำการเพาะเลี้ยง และเก็บเกี่ยวเพียงครั้งเดียวเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง การ
 เพาะเลี้ยงเช่นนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบมาตรฐานที่สะดวก การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบนี้สามารถจะ
 ควบคุมปัจจัยทางกายภาพได้ คือ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายน้ำ การให้อากาศ
 การกวน และการป้องกันการเกิดฟอง (วิเชียร กิจปรีชาวนิช, 2562)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบตารางที่ 4 แสดงให้เห็นได้ว่าการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ
 ด้วยกัน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะใช้ในการผลิตเซลล์ค่อนข้างได้ความเข้มข้นที่ต่ำ และความเข้มข้นของ
 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ก็ยังมีข้อจำกัดไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง ๆ ได้ หากใช้แหล่ง
 คาร์บอนสูงเกินไปก็จะมีผลไปยับยั้งการเจริญ ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะร่วมกับ
 แหล่งของคาร์บอนความเข้มข้นที่เหมาะสมก็จะสามารถทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อ
 ต้องการเซลล์ความเข้มข้นสูงก็ต้องใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงเช่นกัน ซึ่งการใช้
 เดกซ์ทรินความเข้มข้น 40 ถึง 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ให้ผลการเจริญของเชื้อ
Bacillus sp. ได้ดีเมื่อเทียบกับผลจากรายงานการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ

ตารางที่ 4 ตารางเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

จุลินทรีย์	ความเข้มข้น แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	เทคนิคการ เพาะเลี้ยง	เวลาการ เพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	ขนาดถัง หมัก (ลิตร)	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)	แหล่งอ้างอิง
<i>B. sphaericus</i>	50	แบบเติมกะ	30	7	5.02	0.170	Singh et al. (2004)
<i>B. megaterium</i>	25	แบบกะ	12	5	8.78	0.732	Kulprecha et al. (2009)
<i>B. megaterium</i>	400	แบบเติมกะ	24	5	72.6	3.025	Kulprecha et al. (2009)
<i>B. natto</i>	20	แบบกะ	23	5	5.06	0.220	Mahajan, Gokhale & Lele, (2010)
<i>B. thuringiensis</i>	16	แบบกะ	12	2	8.3	0.692	Vallejo et al. (1999)
<i>B. thuringiensis</i>	8	แบบเติมกะ	40	2	36.8	0.920	Vallejo et al. (1999)
<i>B. subtilis</i>	100	แบบเติมกะ	120	7	9.46	0.079	Zhu and Xu, (2010)
<i>Bacillus</i> sp.	20	แบบกะ	24	5	4.13	0.172	จากการศึกษานี้
<i>Bacillus</i> sp.	40	แบบกะ	24	5	23.10	0.963	จากการศึกษานี้
<i>Bacillus</i> sp.	100	แบบกะ	24	5	31.98	1.333	จากการศึกษานี้

เมื่อเปรียบเทียบประเภทการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบเดิมกะ จากตารางที่ 4 แล้ว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะให้ผลผลิตเซลล์ค่อนข้างสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะรวมทั้งผลจากการวิจัย แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาของการผลิต พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงยาวนานกว่าแบบกะ ซึ่งค่าใช้จ่ายก็จะเพิ่มมากขึ้นต่อการเพาะเลี้ยง และหากศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนากระบวนการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมแล้วการเพาะเลี้ยงแบบกะมีความได้เปรียบคือ ใช้เวลาการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่า ระบบการเพาะเลี้ยงที่ป้องกันการปนเปื้อนที่ดีกว่า สามารถควบคุมการผลิตที่ง่าย และค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า อีกทั้งการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะที่มีการใช้เดกซ์ตรินเป็นแหล่งคาร์บอนก็ส่งเสริมให้มีการผลิตมวลเซลล์สูงได้เช่นกัน

การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบกะที่ระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

จากการศึกษาการขยายการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. เพื่อเป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการผลิตไปสู่ระดับโรงงานต้นแบบขนาดถังหมัก 30 ลิตร ปริมาตรในการทำงาน 15 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ใช้เดกซ์ตรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที (vvm) ความเร็วของใบพัดในระยะแรกจะใช้ความเร็ว เท่ากับ 200 รอบต่อนาที ไปจนถึง 6 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็น 500 รอบต่อนาที ใช้อัตราการกวนของใบพัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้เนื่องจากในระยะแรกของการเติมหัวเชื้อลงในถังหมักตั้งแต่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง ซึ่งยังเป็นช่วงการปรับตัวให้สามารถใช้อาหารใหม่ได้ จึงยังคงมีการเจริญในระดับต่ำอยู่ ความต้องการใช้ออกซิเจนน้อย และเมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้น ความต้องการใช้ออกซิเจนจึงเพิ่มขึ้นตาม จึงมีการปรับความเร็วของใบพัดเป็น 500 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการเพิ่มอากาศจากการกวน ทำให้มีปริมาณออกซิเจนเพียงพอต่อความต้องการสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งพบว่าการเจริญ *Bacillus* sp. ในถังหมักขนาด 30 ลิตรนี้มีการเจริญเติบโตที่ดี เห็นได้จากค่าตัวแปรทางจลน์พลศาสตร์การเจริญ ที่มีค่ามวลเซลล์ (x) เท่ากับ 43.49 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.21 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.85 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการใช้น้ำตาล (r_s) เท่ากับ 3.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกรเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 30 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงกว่าถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ผลผลิตมวลเซลล์สูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 35.99 เนื่องจากถังหมักขนาด 30 ลิตร มีระบบการกวนผสมที่ดีส่งผลให้

มีปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอและยังลดการรวมกลุ่มของเซลล์ที่ส่งผลให้เกิดตะกอน นอกจากนี้สภาวะการเพาะเลี้ยงก็มีความเหมาะสม จึงมีความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในระดับ 30 ลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยของ Kanjanachumpol และคณะ (2013) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* โดยใช้กากน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ ให้ผลมวลเซลล์เท่ากับ 32.48 กรัมต่อลิตร การสร้างมวลเซลล์ต่อการใช้น้ำตาล เท่ากับ 0.67 กรัมต่อกรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตเมื่อขยายขนาดจากถังหมัก 5 ลิตร เป็น 10 ลิตร ให้ผลผลิตมวลเซลล์ร้อยละ 9.5 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าตัวแปรต่าง ๆ แล้ว พบว่าผลของการเพาะเลี้ยงที่ได้มีประสิทธิภาพสูงกว่า เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Huang, Ridgway, Gu, and Moo-Young, (2004) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 31784 ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงทั้งแบบกะและแบบเติมกะ ซึ่งแบบกะใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 22 ลิตร ซึ่งให้มวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.3 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 14 ชั่วโมง และการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 4.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นก็มีการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 500 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 22 ลิตร พบว่าได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 17.6 กรัมต่อลิตร ที่ 28 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Yang และคณะ (2012) ที่เพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในถังหมักขนาด 30 ลิตร ให้มวลเซลล์ความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 7 ถึง 8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแล้วพบว่าผลการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 30 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงกว่ารายงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทั้งรูปแบบของการเพาะเลี้ยงและความสามารถในการใช้เดกซ์ทรินของ *Bacillus* sp. และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความเหมาะสม

การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. แบบกะที่ระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร
จากการศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ทั้งขนาดถังหมัก 5 ลิตร และ 30 ลิตร ซึ่งสามารถผลิตมวลเซลล์ของ *Bacillus* sp. ได้ความเข้มข้นสูง จึงได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบ โดยใช้ถังหมักขนาด 300 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 200 ลิตร ร่วมกับการใช้แหล่งคาร์บอนจากเดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยทั่วไปแล้วการขยายขนาดการผลิตเพื่อเป็นต้นแบบของการผลิตในระดับอุตสาหกรรม มีวิธีการเดียว คือ การขยายขนาดถังหมักซึ่งจะต้องพิจารณาความคล้ายคลึงทางเรขาคณิตและสภาวะการทำงานคล้ายกัน โดยที่ถังเพาะเลี้ยงแบบกะเป็นถังหมักที่ง่ายต่อการขยายขนาด และมีการนำมาใช้มากที่สุด ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การผลิตสารเคมี และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นอกจากรูปทรงแล้วค่าสภาวะการ

เพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงนั้นประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ของการผลิตนั้น ๆ ได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ภายในถังหมักขนาด 300 ลิตร มีสถานะการเพาะเลี้ยงดังนี้ ค่าความเป็นกรด ค่าเท่ากับ 6.5 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที อัตราการกวนผสมความเร็วของใบพัดเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ภายใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นปรับความเร็วเพิ่มเป็น 300 รอบต่อนาที จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ให้ผลผลิตมวลเซลล์ (x) สูงถึง 47.03 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง ผลผลิตมวลเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.63 กรัมต่อกรัม อัตราการสร้างมวลเซลล์ (r_x) เท่ากับ 3.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ (r_s) เท่ากับ 6.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 30 ลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 300 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักทั้งสองขนาด และเมื่อเทียบกับรายงานการวิจัยของ Kanjanachumpol และคณะ (2013) เพาะเลี้ยง *B. megaterium* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในถังหมักขนาด 90 ลิตร ให้ผลการผลิตมวลเซลล์ 35.60 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Gao และคณะ (2014) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *B. velezensis* โดยใช้แหล่งของคาร์บอนจากแกลบความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในถังหมักขนาด 100 ลิตร ให้ผลผลิตมวลเซลล์ เท่ากับ 1.46 กรัมต่อลิตร และในงานวิจัยของ Jo และคณะ (2008) เพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* โดยใช้แหล่งของคาร์บอนจากกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร เพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 100 ลิตร ให้ผลผลิตมวลเซลล์ประมาณ 25 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกันแล้ว ผลจากการศึกษาการขยายขนาดการผลิตในครั้งนี้ให้ผลการผลิตมวลเซลล์ของ *Bacillus* sp. สูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงระดับอุตสาหกรรม

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. อาหารสูตร Batch Production Medium (BPM) มีประสิทธิภาพดี เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถนำอาหารสูตรนี้ไปพัฒนาและปรับปรุงโดยอาจเปลี่ยนแหล่งของคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน หรือสารส่งเสริมการเจริญเติบโตอื่น ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ต่อไปได้ เนื่องจากอาหารสูตร BPM

เป็นอาหารประเภท defined medium ที่มีข้อดีที่ทราบชนิดขององค์ประกอบ ปริมาณที่แน่นอนและสามารถควบคุมคุณภาพได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้

2. เดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง มีประสิทธิภาพและความเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. เพื่อผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูง เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสทางการค้า และกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งให้ความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 12.93 กรัมต่อลิตร จากการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์

3. *Bacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีในการเพาะเลี้ยงที่ใช้เดกซ์ทรินที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเทียบกับการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นที่ 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

4. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ร่วมกับการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ในถังหมักขนาด 30 ลิตร เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 43.49 กรัมต่อลิตร

5. การขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ร่วมกับการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ไปสู่ระดับโรงงานต้นแบบ ในถังหมักขนาด 300 ลิตร ซึ่งกระบวนการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนี้มีประสิทธิภาพและความเหมาะสมที่ใช้เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง ซึ่งได้ความเข้มข้นถึง 47.03 กรัมต่อลิตร

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ปริมาณออกซิเจน การกวนผสม ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อส่งเสริมการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2. การวิจัยในครั้งนี้อาจจำกัดความเข้มข้นเดกซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนเพียง 100 กรัมต่อลิตร เท่านั้น ซึ่งควรมีการทดลองการเพาะเลี้ยงให้ใช้ความเข้มข้นของเดกซ์ทรินที่สูงขึ้น เพื่อพิสูจน์ความสามารถในการใช้เดกซ์ทรินความเข้มข้นสูงสุด เพื่อให้ได้ปริมาณมวลเซลล์ที่จะได้เพิ่มมากขึ้น

3. ควรมีการศึกษาพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ เช่น เทคนิคการเพาะเลี้ยงหลายกะ ต่อเนื่อง เพื่อเปรียบเทียบการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์ความเข้มข้นสูงเพิ่มมากขึ้น

บรรณานุกรม

- กัญญาวิวี คำ. (2561). การผลิตอัลคาไลน์คอปติเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ขวัญฤทัย มาลัยเรือง. (2556). การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ขวัญฤทัย มาลัยเรือง และ เศรษฐวัชร นำศาสตร์. (2557). การเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบหลายกะเป็นลำดับต่อเนื่อง. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา (ครั้งที่ 15). มหาวิทยาลัยขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. (2555). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: หจก. วิ.เจ.พรินติ้ง.
- พรพรรณ พรหมพันใจ. (2552). สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดที่ใช้ผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวไทเรต. ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วสุ ปฐมอารีย์. (2561). จุลชีววิทยาและการประยุกต์. เชียงใหม่: ศูนย์บริหารงานวิจัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช. (2562). กระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์จากรา *Rhizopus* กรุงเทพฯ: หจก.วนิดาการพิมพ์ จังหวัดนนทบุรี.
- เศรษฐวัชร นำศาสตร์. (2557). เอกสารประกอบการสอนวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สมใจ ศิริ โภค. (2555). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมสื่อกรุงเทพ.
- สารานุกรมเสรี. (2561). กลูโคส. เข้าถึงได้จาก <https://th.wikipedia.org/wiki/กลูโคส>
- สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร. (2559). หลักการเบื้องต้นของเทคโนโลยีกระบวนการผลิตทางชีวภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. (2547). แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. นครปฐม: โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล

- Babaeipour, V., Shojaosadati, S. A., Robotjazi, S. M., Khalilzadeh, R., & Maghsoudi, N. (2007). Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 42(1), 112-117.
- Babu, K. R. & Satyanarayana, T. (1995). α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 30(4), 305-309.
- Barros, F. F., Simiqueli, A. P., de Andrade, C. J. & Pastore, G. M. (2013). Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*, 2013, 103960.
- BeMiller, J. N. (2003). Dextrin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2, 1773-1775.
- Bezbaruah, R. L., Gogoi, B. K. & Pillai, K. R. (1994). Optimization of alkaline amylase production by thermophilic *Bacillus stearothermophilus* AN002. *Journal of Basic Microbiology*, 34(3), 139-144.
- Bocchini, D. A., Oliveira, O. M. M. F., Gomes, E. & Silva, R. D. (2005). Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 40(12), 3653-3659.
- Bunch, A. W. (1994). High-cell-density growth of micro-organisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 12, 535-561.
- Castan, A., Näsman, A., & Enfors, S.-O. (2002). Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(7), 847-854.
- Chang, C. C., Ryu, D. D. Y., Park, C. S., Kim, J.-Y., & Ogrydziak, D. M. (1998). Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage, cyclic fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(5), 531-537.
- Chang, W.-T., Chen, M.-L. & Wang, S.-L. (2009). An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 945-950.
- Chang, W. T., Chen, C. S. & Wang, S. L. (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiology*, 47(2), 102-108.

- Claus, D., & Berkeley, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn, 1872. In: *Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt. J.G., Eds., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 2, 1105-1139.*
- Curless, C., Fu, K., Swank, R., Menjares, A., Fieschko, J., & Tsai, L. (1991). Design and evaluation of a two-stage, cyclic, recombinant fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering, 38, 1082-1092.*
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Glick, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter *Journal of Industrial Microbiology, 16(3), 145-154.*
- El-Enshasy, H., & El-Shereef, A. A. (2008). *Saccharomyces boulardii* Adapted to Dryness Stress Optimization of High Cell Density Cultivation of Yeast. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 104, 389-394.*
- Fuchs, C., Köster, D., Wiebusch, S., Mahr, K., Eisbrenner, G. Markl, H. (2002). Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology 93, 243-251.*
- Gao, W., Kim, H. J., Chung, C. H. & Lee, J. W. (2014). Enhanced Production of carboxymethylcellulase by a marine bacterium, *Bacillus velezensis* A-68, by using rice hulls in pilot-scale bioreactor under optimized conditions for dissolved oxygen. *Journal of Microbiology, 52(9), 755-761.*
- Gill, R. K. & Kaur, J. (2004). A thermostable glucoamylase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and thermostability. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31(11), 540-543.*
- Hoeks, F., Boon, L., Studer, F., Wolff, M., Van der Schot, F., Vrabel, P., Van der Lans, R., Bujalski, W., Manelius, A., Blomsten, G., Hjorth, S., Prada, G., Luyben, K., & Nienow, A. (2003). Scale-up of stirring as foam disruption (SAFD) to industrial scale. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 30(2), 118-128.*
- Huang, H., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. (2004). Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 27(1), 63-69.*

- Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P., & Enfors, S.-O. (2003). Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories* 2(6), 1-11.
- Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E. F., Bruckner, R. & Titgemeyer, F. (2008). Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 891-907.
- Jensen, E. B., & Carken, S. (1990). Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli*; Expression of Different Precursors and Physiological Effects of Glucose, Acetate, and Salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 1-11.
- Jo, K.-I., Lee, Y.-J., Kim, B.-K., Lee, B.-H., Chung, C.-H., Nam, S.-W., Kim, S.-K. & Lee, J.-W. (2008). Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(2), 182-188.
- Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V., & Thongchul, N. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high-cell-density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(10), 1463-1474.
- Krahe, M., Antranikian, G., & Märkl, H. (1996). Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 271-285.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 240-245.
- Kunamneni, A. & Singh, S. (2006). Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1399-1404.
- Kwon, E. Y., Kim, K. M., Kim, M. K., Lee, I. Y., & Kim, B. S. (2011). Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(7), 789-793.
- Lee, S. Y. (1996). High-cell-density culture of *Escherichia coli* *Trends in Biotechnology*, 14(3), 98-105.
- Mahajan, P. M., Gokhale, S. V. & Lele, S. S. (2010). Production of nattokinase using *Bacillus natto* NRRL 3666: Media optimization, scale up, and kinetic modeling. *Food Science and Biotechnology*, 19(6), 1593-1603.

- Malairuang, K., Krajang, M., Rotsattarat, R., & Chamsart, S. (2020). Intensive Multiple Sequential Batch Simultaneous Saccharification and Cultivation of *Kluyveromyces marxianus* SS106 Thermotolerant Yeast Strain for Single-Step Ethanol Fermentation from Raw Cassava Starch. *Processes*, 8(8). doi:10.3390/pr8080898
- Matsui, T., Shinzato, N., Yokota, H., Takahashi, J., & Sato, S. (2006). High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. *Process Biochemistry*, 41(4), 920-924.
- Paalme, T., Elken, R., Vilu, R., & Korhola, M. (1997). Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 217-230.
- Paalme, T., Kahru, A., Elken, R., Vanatalu, K., Tiisma, K., & Vilu, R. (1995). The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate. *Journal of Microbiological Methods*, 24, 145-153.
- Pasut, G. (2014). Polymers for Protein Conjugation. *Polymers*, 6(1), 160-178.
- Ramasahayam, S., Koppuravuri, S. H., Arora, L., & Chowdhury, S. R. (2015). Noninvasive blood glucose sensing using near infra-red spectroscopy and artificial neural networks based on inverse delayed function model of neuron. *Journal of Medical systems*, 39(1), 166.
- Rashid, M. M., Hizbullah, Mohammad, N., & Jakir H Khan, M. (2012). Advanced Control Technique for Substrate Feed Rate Regulation of a Fed Batch Fermentation. *Asian Journal of Biochemistry*, 7, 1-15.
- Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Kumar Das, S. & Gupta, S. (2014). Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation. *Biochemistry Research International*, 2014, 1-5.
- Riesenberg, D., & Guthke, R. (1999). High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 422-430.
- Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I., & Chambliss, G. H. (1998). *Bacillus*. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology*, 2, 709-729.
- Schaeffer, P., Millet, J., & Aubert, J. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America* 54 704–711.
- Sekar, K., Rusconi, R., Sauls, J. T., Fuhrer, T., Noor, E., Nguyen, J., Fernandez, V. I., Buffing, M. F., Berney, M., Jun, S., Stocker, R. & Sauer, U. (2018). Synthesis and degradation of FtsZ

- quantitatively predict the first cell division in starved bacteria. *Molecular Systems Biology*, 14(11), 1-14.
- 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., Babaeipour, V., & Farnoud, A. M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal Of Biotechnology*, 6(2), 63-84.
- Singh, J., Vohra, R. M. & Sahoo, D. K. (2004). Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 39(9), 1093-1101.
- Srivastava, R. A. & Baruah, J. N. (1986). Culture Conditions for Production of Thermostable Amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 52(1), 179-184.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. & Hall, S. J. (1995). CHAPTER 4 - Media for Industrial Fermentations. P. F. Stanbury, A. Whitaker S. J. Hall, *Principles of Fermentation Technology (Second Edition)* (93-122). Amsterdam: Pergamon.
- Suzuki, T., Yamane, T., & Shimizu, S. (1987). Mass production of thioestrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat modal feeding of multi-substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25, 526-531.
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X. & Chen, W. (2016). Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 41-49.
- Vallejo, F., González, A., Posada, A., Restrepo, A. & Orduz, S. (1999). Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture. *Biotechnology Techniques*, 13(4), 279-281.
- Vuolanto, A., Weymarn, N. v., Kerovuo, J., Ojamo, H., & Leisola, M. (2001). Phytase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 23, 761-766.
- Werner, R. G. (2004). Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3), 171-182.

- Yang, T., Zhang, X., Rao, Z., Gu, S., Xia, H. & Xu, Z. (2012). Optimization and scale-up of 2,3-butanediol production by *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127. *World J Microbiol Biotechnol*, 28(4), 1563-1574.
- Zhang, J., Zhou, J., Liu, J., Chen, K., Liu, L., & Chen, J. (2011). Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonicigenium vulgare* and *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 102(7), 4807-4814.
- Zhang, W., Li, Z. J., & Agblevor, F. A. (2005). Microbubble fermentation of recombinant *Pichia pastoris* for human serum albumin production. *Process Biochemistry*, 40(6), 2073–2078.
- Zhang, X. Z., Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z. & Percival Zhang, Y. H. (2011). One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metabolic Engineering*, 13(4), 364-372.
- Zhong, J., Zhang, X., Ren, Y., Yang, J., Tan, H., & Zhou, J. (2014). Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jjean-peptide production in fed-batch fermentation using central composite design. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3), 132-136.
- Zhu, B.-F. & Xu, Y. (2010). Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37, 815-821.
- Zukowski, M. M. (1992). *Production of commercially valuable products. Biology of Bacilli : Application to Industry*, In R.E., Doi, M., McGloughlin (eds). Boston: Butterworth-Hoffman.

ภาคผนวก



2820514691

BUU iThesis 59910006 thesis / rcv: 01082563 15:02:13 / seq: 35

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Broth (NB)

ส่วนประกอบ

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Beef extract	3	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ค่า pH เท่ากับ 7 แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Batch Production Medium (BPM)

ส่วนประกอบ

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.10	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.75	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	0.90	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10	กรัมต่อลิตร
Glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ค่า pH เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. สูตรสารอาหารรอง (trace element solution)

ส่วนประกอบ

แอมโมเนียมเฟอริกซิเตรท (Ammonium ferric citrate)	0.006	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.01	กรัมต่อลิตร
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.0003	กรัมต่อลิตร
โคบอลตคลอไรด์ (CoCl_2)	0.0002	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO_4)	0.0001	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.00003	กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดต (Na_2MoO_4)	0.00003	กรัมต่อลิตร
นิกเกิลซัลเฟต (NiSO_4)	0.00002	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	0.00001	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกันเป็นเนื้อเดียวในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แช่เย็นจนกว่าจะใช้ผสมกับอาหาร Production medium

4. สูตรอาหาร Schaeffer's medium (Schaeffer et al., 1965)

ส่วนประกอบ

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	5.32	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	6.4	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	กรัมต่อลิตร
CaCl_2	0.1	กรัมต่อลิตร
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.08	กรัมต่อลิตร
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.019	กรัมต่อลิตร
Glucose	15	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ค่า pH เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบ

Na_2CO_3	200	กรัมต่อลิตร
--------------------------	-----	-------------

ชั่ง Na_2CO_3 หนัก 200 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

6. การเตรียมเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

6.1 เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการย่อยแป้ง ได้แก่ ถังย่อยแป้งขนาด 5 ลิตรที่มี Jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิ บีม สายยางซิลิโคน อ่างควบคุมอุณหภูมิ มอเตอร์และใบพัดสำหรับการกวนผสม

6.2 ตัดตั้งอุปกรณ์ต่างๆ ตั้งค่าอุณหภูมิของอ่างควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส แล้วต่อเข้ากับ Jacket ของถังย่อยแป้ง ใช้อัตราการกวนผสมเท่ากับ 400 รอบต่อนาที

6.3 เติมน้ำในถังย่อยแป้งส่วนหนึ่ง รอคอยที่อุณหภูมิในถังประมาณ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่อยๆ

เติมแป้งมันสำปะหลังที่ละนิดจนหมด (ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์) ปรับปริมาตรจนครบตามต้องการ

6.4 ร่อนกระทั่งอนุภาคน้ำตาลเท่ากับ 95 องศาเซลเซียส แล้วจับเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะได้สารละลายเด็กซ์ทรินที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดเล็กน้อย และมีสีส้มขุ่น ซึ่งมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (DE) ประมาณ 3 ถึง 10

7. การเตรียมกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง เป็นกระบวนการที่ต่อเนื่องจากการย่อยเด็กซ์ทริน

7.1 หลังจากได้สารละลายเด็กซ์ทรินจากการย่อยแป้งในข้อ 5 แล้ว จะทำการลดอนุภาคน้ำตาลในถังย่อยแป้งลงให้เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

7.2 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

7.3 กวนผสมนาน 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายกลูโคสที่มีลักษณะหนืดเล็กน้อย สีเหลืองใส ซึ่งมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (DE) ประมาณ 90 ถึง 95

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์และกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS

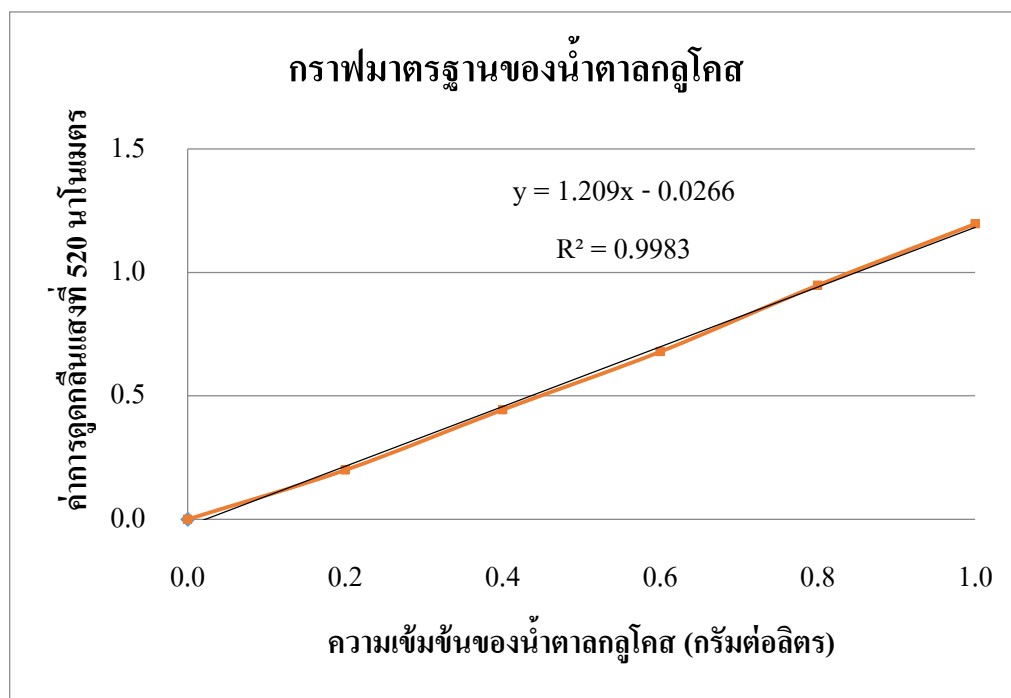
1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์
เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปปรับปริมาตร
ให้เป็น 200 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylid acid: DNS)
เตรียมโดยชั่ง DNS มา 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ละน้อย คนให้เข้ากันจน
ละลายโดยการให้ความร้อนจนใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมทาร์เตต 300 กรัม ตามลำดับ คนให้
ละลาย รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ 1 คืน
ก่อนนำมาใช้วิเคราะห์

1.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร
เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้น	ค่าความขุ่นที่ 520 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	SD
0.0	0.000	0.000	0.000	0.00	0.00
0.2	0.203	0.198	0.198	0.20	0.00
0.4	0.467	0.424	0.441	0.44	0.02
0.6	0.681	0.682	0.674	0.68	0.00
0.8	0.945	0.954	0.945	0.95	0.01
1.0	1.218	1.200	1.172	1.20	0.02



ภาพกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส