การพัฒนาอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง

Development of Medium for High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli* DH5α in Bioreactor

อติกานต์ สติปัฏฐาน, ชนิตโชต ปิยพิทยานันต์ และเทพปัญญา เจริญรัตน์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

วาสนา สุขุมศิริชาติ

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

Atikant Satipattarn, Chanitchote Piyapittayanun and Theppanya Charoenrat*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Wasana Sukhumsirichart

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Klongtoey Nau, Wattana, Bangkok 10110

Received: June 30, 2020; Accepted: August 14, 2020

บทคัดย่อ

ระบบการแสดงออกโดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพและประหยัด ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลผลิตจากระบบการแสดงออกนี้สูงที่สุด การเพิ่มขนาดการเพาะเลี้ยงและการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์จึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็น อย่างไรก็ตาม *E. coli* บางสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในงานทางพันธุวิศวกรรมมีความบกพร่องของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น *E. coli* DH5α ที่ไม่สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์ที่ถูกออกแบบสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง ดังนั้นเพื่อที่จะสามารถเพาะเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่มีความบกพร่องในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรใหม่จึงมีการพัฒนาขึ้นโดยเติมยีสต์สกัดและเพปโตนลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund และเรียกชื่ออาหารที่พัฒนาขึ้นใหม่ว่าอาหาร Bylund:LB ซึ่ง *E. coli* DH5α สามารถเจริญเติบโตในอาหาร Bylund:LB และเมื่อใช้อาหาร Bylund:LB ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ด้วยกระบวนการแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าอาหาร Bylund:LB ที่มียีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และเพปโตน 2 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความขุ่นของเซลล์ 17.70 ขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 2 กรัมต่อลิตร และเพปโตนเป็น 4 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ค่าความขุ่นของ

*Corresponding author: theppanya_c@sci.tu.ac.th

DOI: 10.14456/tjst.2020.88

เซลล์ 53.10 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของยีสต์สกัดและเพปโตนที่เติมลงในอาหาร Bylund:LB

คำสำคัญ : การพัฒนาสูตรอาหาร; ความหนาแน่นเซลล์สูง; การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์; *Escherichia coli*

Abstract

Escherichia coli expression system is a robust and cost-effective recombinant protein expression system. In order to maximize the productivity of this system, increasing the cultivation scale and cell density is necessary. However, several engineered *E. coli* strains, such as *E. coli* DH5α, are auxotrophic mutants therefore are unable to grow in the synthetic medium that is generally designed for high cell density cultivation. Thus, to achieve high cell density of the auxotrophic mutant strains of *E. coli*, the cultivation medium was newly developed by supplementing yeast extract and peptone to the Bylund's synthetic medium, designated Bylund:LB medium. The results showed that *E. coli* DH5α was able to grow and reached OD_{600} of 17.70 in Bylund:LB medium with 1 g/L yeast extract and 2 g/L peptone using fed-batch process in a bioreactor. However, an increase in yeast extract to 2 g/L and peptone to 4 g/L did improve the OD_{600} to 53.10. It was obvious that the obtained cell density was directly correlated to an increase in yeast extract concentrations and peptone supplemented in Bylund:LB medium.

Keywords: medium development; high cell density; Fed-batch culture; *Escherichia coli*

1. คำนำ

แบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นเชื้อที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านการศึกษา วิจัย และอุตสาหกรรม เช่น การใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนและผลิตโปรตีน อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ *E. coli* ที่มีสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้งานในแต่ละวัตถุประสงค์ มีความจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุกรรมของ *E. coli* อย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้เกิดการกลายสะสม ซึ่งทำให้ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุกรรมอย่างต่อเนื่องมีความสามารถในการเจริญที่ลดลง (Jung *et al*., 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) ทำให้การใช้ประโยชน์จาก *E. coli* สายพันธุ์ที่ขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ถูกจำกัดอยู่เฉพาะในระดับห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการใช้ *E. coli* ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้อาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเพราะมีราคาถูกและสามารถเพาะเลี้ยงจนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง (Riesenberg *et al*., 1991)

อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยง *E. coli* ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารเคมี เช่น อาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Riesenberg (Riesenberg *et al*., 1991) และอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund (Bylund *et al*., 1998) อย่างไรก็ตาม อาหารสังเคราะห์เหล่านี้ไม่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* กลุ่มที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจนขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งถือเป็นเป็นอุปสรรคในการเลี้ยงเชื้อกลุ่มนี้ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง

ทั้งนี้ข้อจำกัดของ *E. coli* กลุ่มที่ขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ เช่น *E. coli* DH5α และ *E. coli* XL1-Blue ทำให้ Jung และคณะ (Jung *et al*., 2010) ศึกษาเพื่อค้นหายีนซึ่งขาดหายไปหรือบกพร่องไปจนทำให้ *E. coli* กลุ่มดังกล่าวขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งพบว่าคือ ยีน *purB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารพิวรีน (purine biosynthesis) จากนั้นจึงเติมยีน *purB* จาก *E. coli* สายพันธุ์อื่นกลับเข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* DH5α ซึ่งทำให้ *E. coli* DH5α ที่ได้รับยีน *purB* สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์

กรณีของ *E. coli* K12 ER2507 ซึ่งเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวมีความต้องการกรดอะมิโนลิวซีน (leucine auxotroph) ซึ่ง Beckmann และคณะ (Beckmann *et al*., 2017) ได้แก้ปัญหาการขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ของ *E. coli* สายพันธุ์นี้โดยการเติมกรดอะมิโนลิวซีนลงไปในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อโดยตรง แม้ว่าวิธีการดังกล่าวจะช่วยให้เชื้อสามารถเจริญเติบโต แต่กรดอะมิโนลิวซีนมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงและยังละลายน้ำได้น้อยที่พีเอชเป็นกลาง อีกทั้งกรดอะมิโนลิวซีนยังมีราคาสูงด้วย

ข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอาหารสังเคราะห์เป็นอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยง *E. coli* ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง อย่างไรก็ตาม การหายีนซึ่งขาดหายไปหรือบกพร่อง รวมถึงการเติมยีนดังกล่าวเข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ เป็นสิ่งที่ทำได้ยาก ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของนักวิจัยและงบประมาณในการดำเนินการสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเสนอแนวทาง ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหานี้ โดยพัฒนาสูตรอาหารให้ *E. coli* DH5α ซึ่งขาดความสามารถในการเจริญในอาหารสังเคราะห์ทั่วไปให้สามารถเจริญในอาหารที่พัฒนาขึ้นใหม่ รวมถึงมีการทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้อาหารที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *Escherichia coli* DH5α ซึ่งก็บรักษาในรูปสารแขวนลอยเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *E. coli* DH5α ในฟลาสก์เขย่า

การเตรียมกล้าเชื้อ *E. coli* DH5α สำหรับการวิจัยนี้เลือกเตรียมในฟลาสก์เขย่าโดยใช้อาหาร Luria-Bertani (LB, ซึ่งใน 1 ลิตร ประกอบด้วยเพปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 20 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม) โดยนำสารแขวนลอยเซลล์ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ถ่ายลงในฟลาสก์ 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

2.3 การเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในอาหารสังเคราะห์ด้วยกระบวนการแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การวิจัยนี้เลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 22 ลิตร (Biostat® C plus, Sartorius Stedim Biotech, Germany) ซึ่งเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีระบบการทำให้ปลอดเชื้อในตัวเอง และเลือกใช้อาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund (Bylund *et al*., 1998) ซึ่งอาหารสังเคราะห์ 1 ลิตร ประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 11.85 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 4.45 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 2.50 กรัม โซเดียมซิเตรต (Na_3-citrate) 0.50 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.12 กรัม โซเดียมอีดีทีเอ (Na-ETDA) 20 มิลลิกรัม เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$) 16.70 มิลลิกรัม แคลเซียมคลอไรด์มอนอไฮเดรต ($CaCl_2.H_2O$) 0.5 มิลลิกรัม ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) 0.18 มิลลิกรัม คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_2.5H_2O$) 0.16 มิลลิกรัม แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$) 0.15 มิลลิกรัม โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) 0.18 มิลลิกรัม และกลูโคส 10.00 กรัม

กระบวนการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นโดยการถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ปริมาตร 4.50 ลิตร โดยควบคุมค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.3 (OD_{600} ~0.3) และควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที และพีเอช 7.0 โดยในการวิจัยนี้เลือกใช้แอมโมเนียไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นด่างในการควบคุมพีเอช นอกจากนี้เชื้อยังสามารถใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนด้วย การเพาะเลี้ยงในขั้นตอนแบบแบทช์นี้จะสิ้นสุดเมื่อกลูโคสถูกใช้จนหมดซึ่งสามารถติดตามจากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen tension, DOT) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนกว่าเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ แล้วเก็บตัวอย่างต่อไปอีก 1-2 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ในรูปของค่าความขุ่นของเซลล์

2.4 การพัฒนาสูตรอาหารจากอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund สำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการแบบแบทช์ โดยใช้อาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund (ข้อ 2.3) พบว่า *E. coli* DH5α ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund อย่างไรก็ตาม พบว่า *E. coli* DH5α สามารถเจริญในอาหาร LB ดังนั้นผู้วิจัยจึงอาศัยข้อมูลดังกล่าวในการพัฒนาสูตรอาหารโดยการเติมอาหาร LB ลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ในสัดส่วนของอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ต่ออาหาร LB เป็น 100:0 (อาหารควบคุม) 95:5, 90:10, 85:15 และ 80:20 หรือคิดเป็นร้อยละของอาหาร LB ที่เติมลงไป คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ แล้วจึงศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α ในอาหารทั้ง 5 สูตร โดยใช้การเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ในรูปของค่าความขุ่นของเซลล์

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อาหาร Bylund:LB

ผลการศึกษาในหัวข้อที่ 2.4 ผู้วิจัยจึงออกแบบอาหารขึ้นใหม่โดยเติมยีสต์สกัดและเพปโตนลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ให้มีปริมาณเท่ากับการเติมอาหาร LB 20 และ 40

เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ซึ่งเรียกว่าอาหาร Bylund:LB และต่อท้ายด้วยเปอร์เซ็นต์ของอาหาร LB ที่เติมลงไปในอาหาร เช่น อาหาร Bylund:LB20 คือ อาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ที่มีการเติมยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และเพปโตน 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณเท่ากับการเติมอาหาร LB ลงในอาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพของอาหาร Bylund:LB ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง ซึ่งการทดสอบดำเนินการโดยใช้กระบวนการแบบแบทช์-เฟดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่ใช้ในการศึกษานี้แบ่งการดำเนินการเป็น 2 ระยะ ดังนี้

2.5.1 ระยะที่ 1 การเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ดำเนินการเช่นเดียวกับที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อที่ 2.3 โดยใช้อาหาร Bylund:LB โดยเพาะเลี้ยงจนกลูโคสถูกใช้จนหมด ซึ่งถือเป็นการสิ้นสุดระยะที่ 1

2.5.2 ระยะที่ 2 การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ดำเนินการเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์โดยเติมอาหารเฟด-แบทช์ (อาหาร Bylund:LB40 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 500 กรัมต่อลิตร) ด้วยอัตราการเติมอาหารแบบคงที่ 83.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่าออกซิเจนละลายในระบบลดลงเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนรูปแบบการเติมอาหารเป็นแบบ DOT-stat ซึ่งเป็นการควบคุมการเติมอาหารโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นพารา มิเตอร์ในการควบคุมการเติมสับสเตรท โดยควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่ 30 เปอร์เซ็นต์ (Riesenberg *et al*., 1991)

โดยเก็บตัวอย่างทุก 2-6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของกลูโคส รวมถึงนำผลที่ได้มาวิเคราะห์รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์

2.6 วิธีการวิเคราะห์

2.6.1 การเจริญของเซลล์

ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ในสองรูปแบบ คือ (1) การวัดค่าความขุ่นของเซลล์ วิเคราะห์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่อง Biochem Libra S22 Visible Spectrophotometer และ (2) การวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์โดยนำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนตะกอนเซลล์แห้งสนิทและและหาน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.6.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

การวิจัยนี้ใช้วิธีปรับปรุงจากวิธีของ Miller (Miller, 1959) ซึ่งวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นผสมตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่หลอดทดลองลงในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสโดยอาศัยค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลองคำนวณโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2010 ฟังก์ชั่น AVERAGE และ STDEV ตามลำดับ การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยทำโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 ด้วยวิธี unpaired two-tailed t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p \leq 0.05$)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Escherichia coli* DH5α ในฟลาสก์เขย่า

กล้าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวควรเป็นกล้าเชื้อที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะการเจริญเติบโตชะลอตัว (deceleration growth phase) ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีความหนาแน่นสูงและยังคงมีกิจกรรมที่พร้อมจะเจริญเติบโตต่อไปได้ในทันทีหลังจากเติมกล้าเชื้อลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Charoenrat *et al*., 2013) ดังนั้นการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์เขย่า จึงมีความจำเป็นต้องทำเพื่อหาระยะเวลาที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะการเจริญเติบโตชะลอตัว โดยการทดลองนี้เลือกเตรียมกล้าเชื้อในอาหาร Luria-Bertani (LB) ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 โดยพบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential growth phase) ทันที โดยไม่มีระยะในการปรับตัว (lag phase) ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ประมาณจากข้อมูลที่เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล 0.74 ต่อชั่วโมง (รูปที่ 1B) และเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตชะลอตัวที่ 12 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าความขุ่นของเซลล์ 3.88 (รูปที่ 1A) ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ระยะเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง

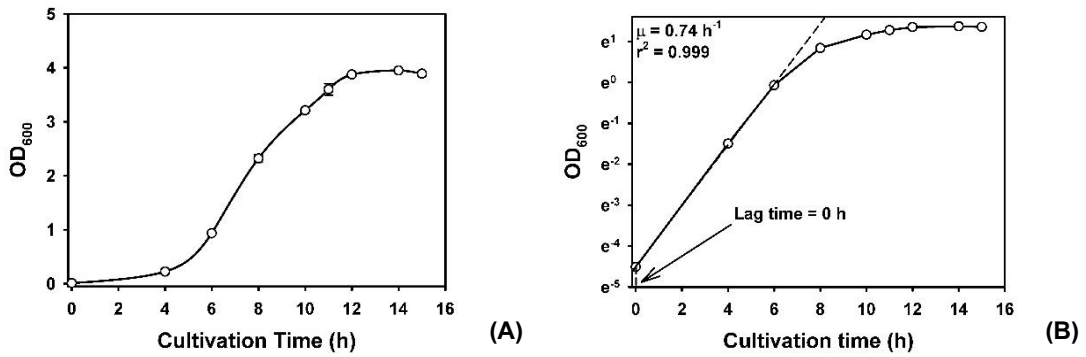

Figure 1 Growth profiles of *E. coli* DH5α during the inoculum preparation in flask culture using LB medium: (A) optical density at 600 nm (OD_{600}) and (B) graphical estimation of specific growth rate

3.2 การเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในอาหารสังเคราะห์ด้วยกระบวนการแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเพาะเลี้ยง *E. coli* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ยีนหรือรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเชิงการค้าหรือในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้อาหารสังเคราะห์ เนื่องจากอาหารสังเคราะห์โดยทั่วไปถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูง ประกอบกับอาหารสังเคราะห์มีราคาถูกกว่าอาหารสมบูรณ์ (Riesenberg *et al*., 1991) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้อาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund (Bylund *et al*., 1998) ซึ่งใช้เพาะเลี้ยง *E. coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่าเมื่อถ่ายกล้าเชื้อ *E. coli* DH5α ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ และหยุดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งเชื้อมีการเจริญเติบโตจนเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตชะลอตัวที่เวลา 6 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่าความขุ่นของ

เซลล์ประมาณ 1 เท่านั้น โดยเมื่อผู้วิจัยได้ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ก็ยังคงให้ผลการทดลองเช่นเดิม (รูปที่ 2) ซึ่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้ถือว่ามีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากงานวิจัยอื่นที่ใช้อาหารสังเคราะห์สูตรนี้ (Bylund *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคสที่เติมลงไปในอาหาร 10 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานถูกใช้ไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วยังคงเหลืออยู่ในน้ำหมักมากถึง 8.0 กรัมต่อลิตร

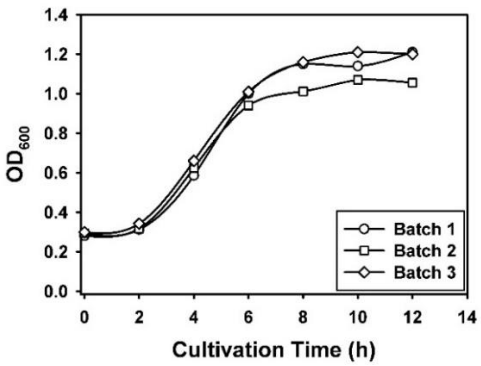

Figure 2 A batch culture growth profile of *E. coli* DH5α in a bioreactor using Bylund's synthetic medium. Three individual runs were performed to confirm the accuracy of results.

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นถึงการจำกัดของสารอาหารบางชนิดที่ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jung และคณะ (Jung *et al*., 2010) ซึ่งให้ข้อมูลว่า *E. coli* DH5α เป็นเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่องทำให้ *E. coli* DH5α เกิดการกลายที่ยีน *purB*$^{\nabla}$ ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์อะดีนีโลซัคซิเนตไลเอส (adenylosuccinate lyase) ในวิถีการสังเคราะห์เพียวรีน (purine synthesis) ส่งผลให้เชื้อนี้ไม่สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์

การที่ *E. coli* DH5α ไม่สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์จึงส่งผลให้การเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นสูงมีความยุ่งยากมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงผลการทดลองในส่วนของการเตรียมกล้าเชื้อ พบว่า *E. coli* DH5α สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร LB แสดงให้เห็นว่ายีสต์สกัดและเพปโตนที่เป็นองค์ประกอบหลักของอาหาร LB มีสารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *E. coli* DH5α ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการรวมองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund เข้ากับอาหาร LB เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูง ดังรายละเอียดซึ่งกล่าวในหัวข้อถัดไป

3.3 การพัฒนาสูตรอาหารจากอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund สำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α

ผลการทดลองในหัวข้อที่ 3.2 ถึงแม้ว่าก่อนหน้านี้จะมีงานวิจัยที่แก้ปัญหาการขาดความสามารถในการเจริญของ *E. coli* ที่เกิดการกลายจนไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ โดยการเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตลงไปในอาหารโดยตรง เช่น การเติมกรดอะมิโนลิวซีนลงไปในอาหารสังเคราะห์เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อในกลุ่มที่มีความต้องการกรดอะมิโนเติมลิวซีน (leucine auxotroph) (Beckmann *et al*., 2017) อย่างไรก็ตาม สำหรับ *E. coli* DH5α การเติมสารเพียวรีนลงไปในอาหารสังเคราะห์โดยตรงมีต้นทุนที่สูงมากจนยากต่อการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ผู้วิจัยจึงพัฒนาอาหารขึ้นใหม่โดยการเติมอาหาร LB ลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ในสัดส่วนต่าง ๆ คือ 0 (อาหารควบคุม) 5, 10, 15 และ 20

เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α ในอาหารที่มีการเติมอาหาร LB ในสัดส่วนต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 พบว่าการเติมอาหาร LB เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถเพิ่มค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุดถึง 3.55 เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารควบคุมที่ให้ค่าความขุ่นสูงสุดเพียง 1.62 ทั้งนี้เมื่อทดสอบผลการทดลองที่ระยะเวลา 10 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้สถิติ t-test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) พบว่าการเติมอาหาร LB ในสัดส่วน 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ค่าความขุ่นของเซลล์ไม่ต่างกัน แต่ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากอาหารทุกสูตรที่มีการเติมอาหาร LB มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารควบคุม

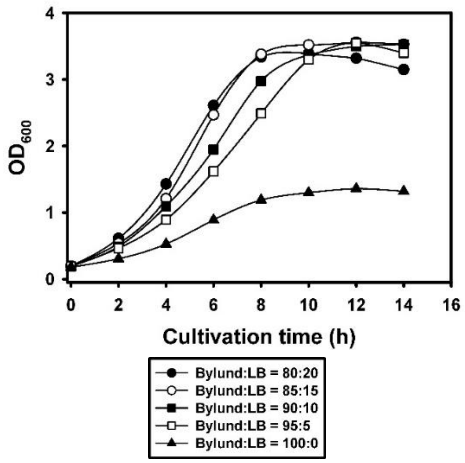

Figure 3 Growth profiles of *E. coli* DH5α in flask culture using Bylund's synthetic medium supplemented with various concentrations of LB medium ranging from 0 (control) to 20 % (v/v) in Bylund's synthetic medium.

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (ตารางที่ 1) พบว่าเมื่อสัดส่วนของอาหาร LB ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund มีค่าสูงขึ้นจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงขึ้น โดยการเติมอาหาร LB ลงไปเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เชื้อมีค่าการเจริญเติบโตจำเพาะประมาณ 0.35 ต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารควบคุมที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะประมาณ 0.25 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้การเติมอาหาร LB ลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ด้วยสัดส่วนที่มากขึ้นส่งผลให้เชื้อมีแนวโน้มในการเจริญเติบโตจนเข้าสู่ระยะคงที่เร็วขึ้น โดยการเติมอาหาร LB ลงในอาหารอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ที่สัดส่วน 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถลดระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเซลล์จนเข้าสู่ระยะคงที่เหลือเพียง 8 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารควบคุมที่ต้องใช้ระยะเวลานานถึง 12 ชั่วโมง จึงจะเข้าสู่ระยะคงที่ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงผลของความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ได้จากอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ที่มีการเติมอาหาร LB ในทุกสัดส่วน พบว่ามีค่าสูงสุดประมาณ 3.5 เท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การมีความเข้มข้นของเซลล์มากขึ้นส่งผลให้ความต้องการออกซิเจนสูงขึ้น ขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในฟลาสก์อัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนถือเป็นปัจจัยจำกัดที่สำคัญ ซึ่งในการเพาะเลี้ยง *E. coli* เมื่อออกซิเจนจำกัดจะส่งผลให้เซลล์มีการสร้างผลพลอยได้ (by-product) ในกลุ่มกรดและแอลกอฮอล์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดซัคซินิก กรดฟอร์มิก และเอทานอล ซึ่งจะส่งผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลง (Pinhal, *et al*., 2019)

Table 1 The influence of LB medium supplement in Bylund's synthetic medium to the growth of *E. coli* DH5α in flask culture

Percent (v/v) of LB medium in Bylund's medium	OD_{600}[1]	Time (h)[2]	$\mu(h^{-1})$
Bylund:LB = 80 : 20	3.34	8	0.430
Bylund:LB = 85 : 15	3.38	8	0.421
Bylund:LB = 90 : 10	3.50	12	0.386
Bylund:LB = 95 : 5	3.55	12	0.354
Bylund:LB = 100 : 0	1.36	12	0.267

[1]OD_{600} refers to the optical density of cell suspension at the time that the cell grew into a stationary phase; [2]Time refers to the time that the cell grew into a stationary phase.

ผลการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α ในอาหารแต่ละสูตรที่แสดงดังรูปที่ 3 และตารางที่ 1 สามารถสรุปว่าอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ที่เติมอาหาร LB ลงไป 5-10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในฟลาสก์เขย่าได้ดี อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพบว่าเป็นเรื่องที่ยากที่จะสรุปว่าอาหารอาหารสูตรใดเป็นอาหารสูตรที่ดีที่สุด เนื่องจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมอาหาร LB ทุกสูตรมีค่าใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะมีค่าสูงสุดและระยะเวลาที่ให้ค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุดจะมีค่าน้อยที่สุดเมื่อใช้อาหารที่มีการเติมอาหาร LB ในปริมาณที่มากที่สุดก็ตาม ทั้งนี้สภาวะแวดล้อมและปัจจัยควบคุมต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์และการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าต่างกันเป็นอย่างมาก เช่น ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถควบคุมค่าพีเอช ขณะที่การเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ทำไม่ได้ การกวนผสมและการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีประสิทธิภาพสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ผู้วิจัยจึงคาดว่าหากเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้อาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ที่มีการเติมอาหาร LB น่าจะให้ค่าความขุ่นของเซลล์ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเรียกอาหารนี้ว่าอาหาร Bylund:LB20 ซึ่งเป็นอาหารที่มีการเติมยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และเพปโตน 2 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund โดยปริมาณยีสต์สกัดและเพปโตนที่เติมมีปริมาณเท่ากับที่มีในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ที่มีการเติมอาหาร LB 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นสัดส่วนสูงที่สุด และทดสอบคุณภาพของอาหาร Bylund:LB20 ด้วยการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการแบบเฟด-แบทช์ในหัวข้อต่อไป

3.4 การเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อาหาร Bylund:LB

เนื่องจากเป้าหมายหลักของการศึกษานี้คือ การเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง ดังนั้นการทดสอบคุณภาพของอาหาร Bylund:LB20 จึงเน้นการติดตามความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฟด-

แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ผลการทดลองพบว่าเชื้อมีรูปแบบการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4A และตารางที่ 2

ช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์พบว่าใช้เวลาในการดำเนินการประมาณ 8 ชั่วโมง 40 นาที โดยเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์น้ำหมักที่ได้มีค่าความขุ่นของเซลล์ 13.0 ซึ่งมีค่าสูงมากกว่าค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (3.34) ประมาณ 3.39 เท่า (ตารางที่ 1) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่านอกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญของ *E. coli* DH5α จากนั้นจึงเริ่มการดำเนินการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยเติมอาหารเฟด-แบทช์โดยอาศัยรูปแบบการเติมแบบ DOT-stat พบว่าค่าความขุ่นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนเริ่มคงที่ที่ 15 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าความขุ่น 19.5 โดยหลังจากชั่วโมงที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าค่าความขุ่นของเซลล์มีแนวโน้มคงที่และมีค่าลดลงถึงแม้ว่าจะมีการเติมอาหารเฟด-แบทช์จนสิ้นสุดกระบวนการก็ตาม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่ามีลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารที่มีสารอาหารบางชนิดถูกจำกัด (Awua *et al.*, 2012) ที่น่าจะมีสาเหตุมาจากการเติมยีสต์สกัดและเพปโตนไม่เพียงพอต่อความต้องการของกระบวนการที่ต้องการให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์มีค่าสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์แนวคิดดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเพิ่มปริมาณการเติมยีสต์สกัดและเพปโตนลงในอาหาร Bylund:LB เป็นยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเพปโตน 4 กรัมต่อลิตร และเรียกอาหารนี้ว่าอาหาร Bylund:LB40 จากนั้นจึงทดลองใช้อาหาร Bylund:LB40 ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการแบบเฟด-แบทช์อีกครั้ง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4B และตารางที่ 2

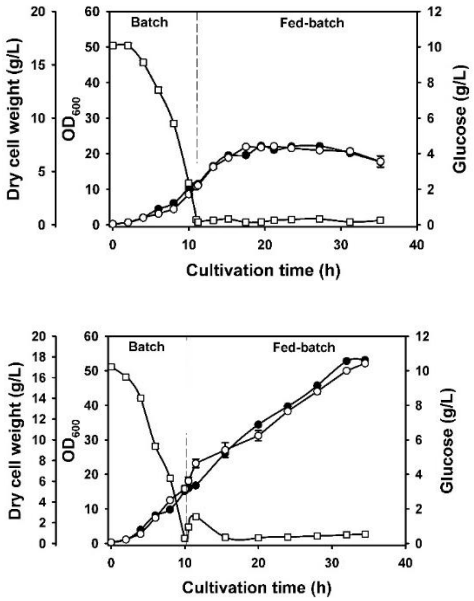

Figure 4 Growth profiles of *E. coli* DH5α in a bioreactor using fed-batch culture with (A) Bylund:LB20 medium and (B) Bylund:LB40 medium

เมื่อเปรียบเทียบผลของการเลี้ยง *E. coli* DH5α ในอาหาร Bylund:LB40 กับ Bylund:LB20 (รูปที่ 4 และตารางที่ 2) พบว่าในช่วงของการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในอาหาร Bylund:LB40 ใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง ซึ่งสั้นกว่าการใช้อาหาร Bylund:LB20 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วงแบทช์ พบว่าอาหารทั้งสองสูตรให้รูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายกัน โดยอาหาร Bylund:LB40 ให้ค่าความขุ่นของเซลล์สูงกว่าอาหาร Bylund:LB20 เล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเจริญเติบโตในช่วงเฟด-แบทช์ พบว่าการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในอาหาร Bylund:LB40 เชื้อจะมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 34.5 ชั่วโมง โดยให้ค่าความขุ่นของเซลล์สูงถึง 53.10 ซึ่งต่างจากผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน

อาหาร Bylund:LB20 ที่เชื้อจะหยุดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและให้ค่าความขุ่นของเซลล์เพียง 17.70 เท่านั้น และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณอาหารเฟด-แบทช์ที่เติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ของทั้งกระบวนการที่ใช้อาหาร Bylund:LB40 และ Bylund:LB20 พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกันประมาณ 510 มิลลิลิตร โดยผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีสต์สกัดและเพปโตนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α หรือกล่าวได้ว่าสารอาหารทั้งสองชนิดเป็น limiting nutrient ที่จำเป็นของ *E. coli* DH5α ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้นมีความจำเป็นต้องเติมยีสต์สกัดและเพปโตนมากขึ้น

Table 2 Kinetic parameters of *E. coli* DH5α growth in a bioreactor using fed-batch culture with Bylund:LB20 medium and Bylund:LB40 medium

Parameters		Culture medium	
		Bylund:LB20	Bylund:LB40
Batch phase	Batch time (h)	11.0	10.0
	OD_{600} (end of batch phase)	11.12	15.20
	μ (h^{-1})	0.496	0.558
Fed-batch phase	Process time (h)	35.2	34.5
	OD_{600} (end of process)	17.70	53.10

4. สรุป

กล้าเชื้อ *E. coli* DH5α สำหรับการศึกษานี้เลือกเตรียมในอาหาร LB ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อมีค่า 12 ชั่วโมง โดยมีค่าความขุ่นของเซลล์ 3.88 ซึ่งเมื่อนำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund พบว่า *E. coli* DH5α มีการเจริญเติบโตน้อยมาก ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อนี้ไม่สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์ ทั้งนี้การเติมยีสต์สกัดและเพปโตนลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ส่งเสริมให้ *E. coli* DH5α เจริญเติบโตได้ และเมื่อทดสอบอาหารที่พัฒนาขึ้นจากอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund โดยเติมยีสต์สกัดและเพปโตนด้วยการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการแบบเฟด-แบทช์ พบว่าการเติมยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และเพปโตน 2 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ 17.70 ขณะที่เมื่อใช้ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และเพปโตน 4 กรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้ได้ค่าความขุ่นของเซลล์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการสูงขึ้นถึง 53.10 ซึ่งสรุปได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดและเพปโตนลงในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Bylund ในสัดส่วนที่มากขึ้นสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อมากขึ้นและให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงขึ้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดและเพปโตนให้สูงขึ้นด้วย

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การ

มหาชน) ปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ PRP6105022810 และขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่สำหรับการทำวิจัย

6. References

Awua, A.K., Doe, E.D. and Agyare, R., 2012, Potential bacterial health risk posed to consumers of fresh coconut (*Cocos nucifera* L.) water, Food Nutr. Sci. 3: 1136-1143.

Beckmann, B., Hohmann, D., Eickmeyer, M., Bolz, S., Brodhagen, C., Derr, P. and Sanders, E.A., 2017, An improved high cell density cultivation–iHCDC–strategy for leucine auxotrophic *Escherichia coli* K12 ER2507, Eng. Life Sci. 17: 857-864.

Bylund, F., Collet, E., Enfors, S.O. and Larsson, G., 1998, Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation, Bioproc. Eng. 18: 171-180.

Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. and Roongsawang, N., 2013, Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis, J. Biosci. Bioeng. 116: 193-198.

Jung, S.C., Smith, C.L., Lee, K.S., Hong, M.E. and Kweon, D.H., Stephanopoulos, G. and Jin, Y.S., 2010, Restoration of growth phenotypes of *Escherichia coli* DH5α in minimal media through reversal of a point mutation in *purB,* Appl. Environ. Microbiol. 76: 6307-6309.

Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31: 426-428.

Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J. and Jong, H., 2019, Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate, J. Bacteriol. 201: e00147-19.

Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W.A., Pohl, H.D., Korz, D., Sanders, E.A., Roß, A. and Deckwer, W.D., 1991, High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate, J. Biotechnol. 20: 17-27.